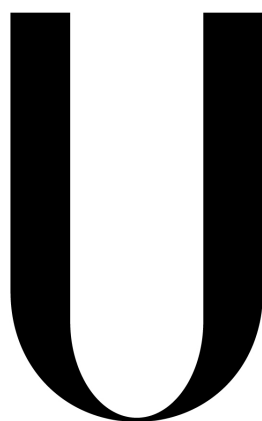


UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Nanopartículas de Eu (III) fluorescentes:
Biosondas imagiológicas**

Inês Filipa Jorge Reis Marques

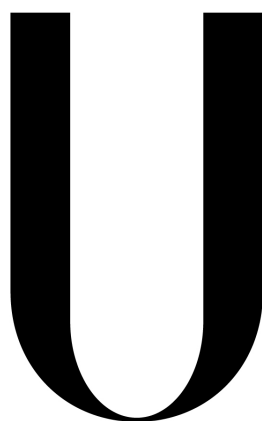
Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica

2013

UNIVERSIDADE DE LISBOA
FACULDADE DE CIÊNCIAS
DEPARTAMENTO DE QUÍMICA E BIOQUÍMICA



LISBOA

UNIVERSIDADE
DE LISBOA

**Nanopartículas de Eu (III) fluorescentes:
Biosondas imagiológicas**

Inês Filipa Jorge Reis Marques

Dissertação

Mestrado em Bioquímica

Especialização em Bioquímica

Orientador(a):

Doutora Carla Nunes

2013

Agradecimentos

Fazer ciência é uma grande aventura. São momentos de grande alegria e entusiasmo e momentos de algum insucesso e tristeza, combina as duas faces de algo que por vezes é complicado alcançar, o puro êxtase e a profunda desilusão. Sinto-me muito satisfeita e lisonjeada por ter tido a oportunidade de integrar este projecto. Neste último ano trabalhei e convivi com diversas pessoas e a elas agradeço todo o apoio, ajuda e paciência. Agradeço por isso:

Ao Centro de Química e Bioquímica que me acolheu e me permitiu ter esta oportunidade integrando este mestrado.

À minha orientadora, Doutora Carla Maria Duarte Nunes, por me ter aceitado, por ter acreditado em mim e por todos os conhecimentos transmitidos. Por toda a disponibilidade, simpatia e alegria ao longo de todo este percurso. E ao Doutor Pedro Miguel Duarte Vaz, por estar sempre presente e ajudado sempre que possível.

À Professora Doutora Maria José Calhorda pelas condições de acolhimento no seu grupo de investigação e pelas facilidades concedidas para a realização do trabalho.

À Professora Doutora Margarida Meireles por toda a sua simpatia, os seus conhecimentos no manuseamento das linhas celulares e todo o material necessário para o mesmo, sem o qual não seria possível realizar um dos objectivos.

À Doutora Carla Real Afonso e à sua aluna, Mestre Ana Bagulho, pela disponibilização da linha celular HeLa e por todo o tempo despendido.

À Doutora Mariela Nolasco pela disponibilidade em realizar os estudos de fluorescência em estado sólido, na Universidade de Aveiro.

À Mestre Cristina Fernandes por ser uma colega de laboratório impecável, mostrando-se sempre disponível e pela ajuda na aprendizagem de técnicas químicas indispensáveis para a realização deste trabalho.

À Doutora Teresa Esteves pelo companheirismo aquando da realização dos estudos celulares.

Ao colega de laboratório e de vida Mário Felício, por todo o apoio, carinho, paciência e amor que precisei ao longo deste percurso, e por ter acreditado sempre em mim mesmo nos piores momentos.

À Catarina Faria por estar sempre presente em todos os momentos da minha vida.

À Joana Ricardo e Jomi Fernandes por serem um exemplo a seguir, em diferentes perspectivas. Ao Luís César, Andreia Pousinha, Carlos Vieira, João Nunes e João Albuquerque, amigos de curso, que eu tanto estimo e aos quais muito devo neste meu percurso académico.

Aos meus pais, Aparecida e Manuel, porque sem eles nada disto seria possível, e ao meu irmão, Eduardo, que por mais pequeno que seja, aturou-me imenso. Não poderia

esquecer de agradecer às pessoas que mais marcaram toda a minha vida e mesmo não estando presentes nunca os esquecerei, o meu maior agradecimento Avó e Avô Jorge.

O meu Muito Obrigada!

Resumo

A nanociência é a uma das mais importantes áreas de investigação na ciência moderna. Ao longo dos últimos anos, o estudo de nanopartículas (NP) tem-se tornado um importante foco de interesse devido às suas propriedades únicas e potenciais aplicações. Os nanomateriais têm dimensões à escala nanométrica exibindo propriedades especiais devido à sua elevada relação superfície/volume. NP nas quais as propriedades magnéticas e ópticas coexistem têm sido muito exploradas para diversas aplicações biomédicas, desde a imagiologia *in vivo* à terapia.

O objectivo deste trabalho foi sintetizar nanopartículas de ferro (NP-Fe) e de sílica (NPS), que foram posteriormente funcionalizadas de modo a preparar biosondas magneto-fluorescentes (NP-Fe) e fluorescentes (NPS). O núcleo das NP-Fe é inactivo, mas contém uma propriedade importante, magnetismo, permitindo que as partículas sejam direccionadas para onde são necessárias, para aplicações como agentes de contraste em imagiologia. As NP-Fe e NPS (sem magnetismo) funcionam como sondas fluorescentes por meio de um complexo de európio (Eu) ancorado que é usado como promotor de fluorescência, recorrendo a ligandos com um sistema aromático condensado – fenantrolina – que funciona como antena.

Todos os materiais foram caracterizados por FTIR, SEM/TEM, DRX, TGA e análise elementar permitindo confirmar, através dos resultados obtidos, que se prepararam biosondas com capacidade magneto-fluorescente e outras com capacidade fluorescente. De modo a avaliar a biocompatibilidade destes materiais para a sua potencial aplicação biomédica, como agentes de contraste, foi realizado o teste do brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio (MTT) nas linhas celulares HeLa e A549 de modo a avaliar a citotoxicidade das amostras. Para todas elas os resultados mostram uma citotoxicidade praticamente nula, e o carácter fluorescente é inalterado em meio celular. Estamos assim perante um novo método com potencial aplicação em imagiologia, representando uma solução menos tóxica e mais viável, economicamente, em relação às existentes.

Palavras-Chave: Nanopartículas de Ferro, Nanopartículas de sílica, Európio, Fenantrolina, Biosonda e Imagiologia

Abstract

Nanoscience is one of the most important research topics in modern science. Over the past few years, nanoparticle (NP) research has become an intense focus due to their unique properties and potential applications. Nanomaterials having nanometer scale dimensions exhibit special properties because of a high surface/volume ratio. NP in which magnetic and optical properties coexist has been widely explored for diverse biomedical applications, ranging from *in vivo* imaging to therapy.

The aim of this study was to synthesize iron (Fe-NP) and silica (SNP) nanoparticles that were subsequently functionalized to prepare, magneto-fluorescent (Fe-NP), and fluorescent (SNP) sensors. The Fe-NP core is inactive, but contains an important property, magnetism, allowing the particles to be directed to where it is needed, for applications such as contrast agents in imaging (MRI). The Fe-NP and SNP (without magnetism) act as fluorescent probes by means of an anchored Europium (Eu) complex which is used as fluorescence promoter, holding condensed aromatic ring ligands working as antenna – phenanthroline – that enhance fluorescence.

All materials have been characterized by FTIR, SEM/TEM, X-Ray, TGA and elemental analysis, obtaining very satisfactory results, because any of those allowed us to conclude that we have prepared a magneto-fluorescent and two fluorescent bioprobes. To evaluate the biocompatibility of these materials for their potential biomedical applications, as contrast agents, 3-(4,5-dimethylthiazol-2-yl)-2,5-diphenyltetrazolium bromide (MTT) assays were performed on HeLa and A549 cell lines to evaluate the cytotoxicity of the samples. Results showed an almost complete absence of cytotoxicity, while their fluorescent character is maintained unaltered in cellular medium for all samples. This work provides new nanomaterials with potential application in imaging, representing a less toxic and more economically viable solution, compared to existing ones.

Keywords: Iron Nanoparticles, Silica Nanoparticles, Europium, Phenanthroline, Bioprobe and Imaging.

Índice

RESUMO	III
ABSTRACT	V
ÍNDICE.....	VII
GLOSSÁRIO.....	IX
CAPÍTULO 1.....	1
INTRODUÇÃO TEÓRICA	3
1.1 NANOCIÊNCIA	3
1.1.1 Nanopartículas.....	4
Nanopartículas Magnéticas (NPM)	5
Nanopartículas de Sílica (NPS).....	7
1.1.2 Funcionalização de Nanopartículas.....	9
1.2 LANTANÍDEOS.....	10
1.2.1 Európio.....	12
1.3 BIOSONDAS FLUORESCENTES	13
1.3.1 Imagiologia de Ressonância Magnética.....	15
1.3.2 Nanopartículas de sílica luminescentes.....	17
1.4 OBJECTIVO DO TRABALHO.....	17
CAPÍTULO 2.....	19
PROCEDIMENTO EXPERIMENTAL.....	21
2.1 MATERIAIS E INSTRUMENTOS.....	21
2.2 SÍNTESE DOS COMPLEXOS.....	21
2.3 SÍNTESE DAS NANOPARTÍCULAS.....	22
2.3.1 Reacção das Nanopartículas de Ferro com os Complexos	23
2.3.2 Reacção das Nanopartículas de Sílica com os Complexos	24
2.4. TÉCNICAS DE CARACTERIZAÇÃO	25
2.4.1 Espectroscopia vibracional de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR).....	26
2.4.2 Difraccção de raios-X de pós (DRX)	26
2.4.3 Análise Termogravimétrica (TGA).....	26
2.4.4 Análise Elementar.....	27
2.4.5 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Transmissão (TEM).....	27
2.4.6 Espectroscopia de UV-Vis.....	27
2.4.7 Estudos de Fluorescência.....	27
Fluorescência em estado sólido	28
2.5 CULTURA DE CÉLULAS E TESTES CITOTÓXICOS <i>IN VITRO</i>	28
2.5.1 Criopreservação e ressuscitação de células congeladas.....	29
2.5.2 Subcultura celular e quantificação.....	29
2.5.3 Teste da actividade citotóxica <i>in vitro</i> utilizando um método colorimétrico.....	30
2.5.4 Estudos de fluorescência nas células.....	31
CAPÍTULO 3.....	33
RESULTADOS E DISCUSSÃO	35
3.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS COMPLEXOS.....	35
3.2 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DAS NANOPARTÍCULAS.....	38

3.2.1 Nanopartículas de Ferro.....	38
3.2.2 Nanopartículas de Sílica.....	43
3.2.3 Estudos de Fluorescência.....	50
3.3 TESTE DE ACTIVIDADE CITOTÓXICA <i>IN VITRO</i>	53
3.3.1 Células HeLa	53
3.3.2 Células A549.....	57
3.3.3 Estudos de Fluorescência em células	61
CAPÍTULO 4.....	63
CONCLUSÃO	65
4.1 SÍNTESE E CARACTERIZAÇÃO DOS NANOMATERIAIS UTILIZADOS	65
4.2 TESTES CELULARES.....	67
4.3 PERSPECTIVAS FUTURAS	68
CAPÍTULO 5.....	71
BIBLIOGRAFIA	73
CAPÍTULO 6.....	77
ANEXOS	79

Glossário

3-APTS – 3-aminopropiltrimetoxissilano

η – Rendimento

λ – Comprimento de onda

λ_{em} – Comprimento de onda de emissão

λ_{exc} – Comprimento de onda de excitação

μg – Micrograma, unidade de massa

μM – Micromolar, unidade de concentração

ν – Frequência

A549 – Linha celular do adenocarcinoma alveolar humano

Abs – Absorvência

C0 – Complexo de Fenantrolina + Európio (1:1)

C1 – Complexo de Fenantrolina + Európio (2:1)

C2 – Complexo de Fenantrolina + Európio (C1) + 3-APTS

DMEM – Meio de cultura *Dulbecco's Modified Eagle's Medium*

DMSO – Dimetil sulfóxido

DRIFT – reflectância difusa de infravermelho com transformada de Fourier

DRX – Difracção de raios-X de pós

ET – Energia de Transferência

Eu – Európio

FF, F, m, f – Muito forte, forte, média, fraca

FTIR – Espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier

g – Grama, unidade de massa

Gd – Gadolínio

HeLa – Linha celular do adenocarcinoma cervical humano

IC₅₀ – Valor de concentração inibitório de 50% do crescimento celular

ISC – Conversão Inter-Sistemas

IV – Infravermelho

La – Lantânio

Ln – Lantanídeo

Lu – Lutécio

M – Molar, unidade de concentração

m_{obt} – Massa obtida

mg – Miligrama, unidade de massa

mL – Mililitro, unidade volume

mmol – Milimol, unidade molar

MRI – Imagiologia de Ressonância Magnética

MTT – Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio

nm – nanómetros, unidade de medida

NMS – Nanopartículas mesoporosas de sílica

NP – Nanopartícula(s)

NP-Fe – Nanopartículas de ferro

NP-Fe-Si_{US} – Nanopartículas de ferro revestidas com sílica por ultrasonicação
NP-Fe-3-APTS – Nanopartículas de ferro revestidas com sílica por ultrasonicação com 3-APTS
NP-FeC1 – Nanopartículas de ferro revestidas com sílica por ultrasonicação com 3-APTS e o C1
NP-FeC2 – Nanopartículas de ferro revestidas com sílica por ultrasonicação com o C2
NP-FeEu – Nanopartículas de ferro revestidas com sílica por ultrasonicação com 3-APTS e Európio
NPM – Nanopartículas magnéticas
NPS – Nanopartículas de sílica
NPS-3-APTS – Nanopartículas de sílica com 3-APTS
NPSC1 – Nanopartículas de sílica com 3-APTS e o C1
NPSC2 – Nanopartículas de sílica com o C2
NPSg – Nanopartículas de sílica com um maior diâmetro
NPSgC1 – Nanopartículas de sílica com um maior diâmetro com 3-APTS e o C1
NPSgC2 – Nanopartículas de sílica com um maior diâmetro com o C2
NSF – Fibrose Sistémica Nefrogénica
ORMOSIL – Sílica modificada organicamente
PBS – Tampão de fosfatos salino
PEG – Polietileno glicol
Phe – Fenantrolina
RMN – Ressonância Magnética Nuclear
rpm – Rotações por minuto, unidade de velocidade angular
RPMI 1640 – Meio de cultura *Roswell Park Memorial Institute*
SBF – Soro bovino fetal
SEM – Microscopia Electrónica de Varrimento
T_{amb} – Temperatura ambiente
TEM – Microscopia Electrónica de Transmissão
TGA – Análise Termogravimétrica
UV-Vis – Ultravioleta visível
Z – Número atómico

CAPÍTULO 1

Introdução Teórica

Introdução Teórica

1.1 Nanociência

A palavra nanociência é a combinação de nano, do Latin “*nanus*”, que significa anão, e a palavra Ciência. Nano refere-se à escala 10^{-9} , ou um bilionésimo. Nestes termos refere-se ao metro, ou ao nanómetro, que está assim na escala de diâmetros atômicos. Para efeito de comparação um cabelo humano tem cerca de 100 mil nanómetros de espessura. A nanociência estuda os átomos, moléculas e objectos, cujo tamanho esteja na escala nanométrica (1-100 nm) [1].

A nanociência é uma das mais importantes áreas de investigação na ciência moderna, como resultado de um esforço continuado em miniaturizar à escala nanométrica processos que até agora ocorreram à escala micro ou superior. De forma a atingir este objectivo, é geralmente aceite que as aproximações do tipo *bottom-up* devem substituir as abordagens clássicas do tipo *top-down*. A nanotecnologia está a começar a permitir que cientistas, engenheiros, químicos e físicos trabalhem ao nível molecular e celular para produzir importantes avanços nas ciências da vida e cuidados de saúde. Pode-se observar na **Figura 1**, um dos maiores pontos de foco actuais da nanociência/nanotecnologia.

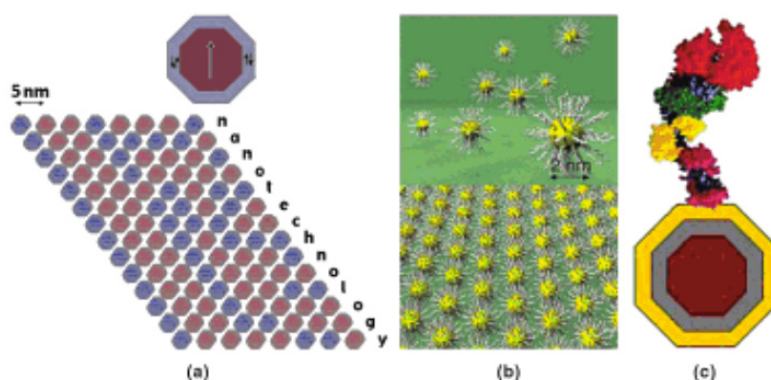


Figura 1. Exemplos do uso da nanotecnologia, como é o caso da funcionalização de nanopartículas [1]. (a) O núcleo das nanopartículas magnéticas (NPM) é um metal ferromagnético (p. ex. ferro ou cobalto) envolvido por uma camada antiferromagnética (p. ex. óxido de cobalto ou manganês). A azul está representada a baixa magnetização, ou 0 e a vermelho a alta magnetização, ou 1. (b) NP de ouro com moléculas de tiol fixadas na camada superficial. (c) O mesmo tipo de NPM que em a), mas revestidas com uma camada de ouro que facilita a fixação de moléculas biológicas, tais como proteínas, anticorpos, ou fármacos.

1.1.1 Nanopartículas

Ao longo dos últimos anos, o estudo de nanopartículas (NP) tem-se tornado um importante foco de interesse devido às suas propriedades únicas e potenciais aplicações. Os nanomateriais têm dimensões na escala nanométrica exibindo propriedades especiais devido à sua elevada relação superfície/volume. À nanoescala as suas propriedades ópticas, electrónicas, magnéticas e catalíticas mudam e todas essas propriedades dependem do seu tamanho e forma, tendo estas assim potenciais aplicações em diversas áreas, como biomedicina/biotecnologia, sensores magnéticos, fluidos magnéticos, dispositivos de armazenamento de dados e catálise entre outras.

As NP são definidas como dispersões particulares ou partículas sólidas com um tamanho no intervalo de 10 a 1000 nm. O complexo/fármaco é dissolvido, aprisionado, encapsulado ou agarrado à matriz da nanopartícula. Dependendo do método de preparação, podem ser obtidas nanopartículas, nanoesferas ou nanocápsulas. As nanocápsulas são sistemas nos quais o complexo/fármaco é confinado a uma cavidade revestida por uma única membrana polimérica, enquanto as nanoesferas são sistemas de matrizes na qual o complexo/fármaco é fisicamente e uniformemente disperso [2].

As vantagens de utilizar nanopartículas em sistemas de transporte de fármacos [3] são:

1. Tamanho das partículas e características da superfície podem ser facilmente manipuladas de modo a atingir tanto passiva como activamente um alvo farmacológico depois de administrações parentéricas;
2. Elas controlam e sustentam a libertação do fármaco durante o transporte e o sítio de localização, alterando a distribuição do fármaco nos órgãos e subsequente absorção do fármaco de modo a aumentar a eficácia terapêutica do mesmo e reduzir efeitos colaterais;
3. A libertação é controlada e as características da degradação da partícula podem ser moduladas pela escolha dos constituintes da matriz. A quantidade de fármaco transportado é relativamente elevada e este pode ser incorporado nos sistemas sem qualquer reacção química, factor importante para preservar a actividade do mesmo;
4. Um alvo em local específico pode ser alcançado através da fixação de ligandos alvo à superfície das partículas ou utilizando uma orientação magnética;
5. O sistema pode ser utilizado em várias formas de administração, tais como oral, nasal, parentérica, intra-ocular, entre outras.

Recentemente, as NP poliméricas biodegradáveis, particularmente as revestidas com um polímero hidrofílico como é o caso do polietileno glicol (PEG), conhecidas como partículas de longa circulação, têm sido usadas como potenciais transportadoras de fármacos devido à sua habilidade em circular por um tempo prolongado para um alvo particular, como transportadores de DNA na terapia genética, e a sua habilidade em transportar proteínas, péptidos e genes [4].

Existem diferentes tipos de NP que são usadas com as mais diversas aplicações em diferentes áreas tanto de investigação como a nível industrial. Neste trabalho irão ser abordadas **dois desses tipos** com funções e características diferentes, as nanopartículas magnéticas (NPM) e as de sílica (NPS).

Nanopartículas Magnéticas (NPM)

As NPM são utilizadas a nível industrial uma vez que abrangem um largo espectro de aparelhos magnéticos e aplicações biomédicas, por exemplo, ressonância magnética de contraste e agentes terapêuticos no tratamento do cancro. Para usos biomédicos, a aplicação de partículas que apresentem um comportamento super-paramagnético à T_{amb} são preferenciais [5].

As aplicações biomédicas das NPM podem ser classificadas de acordo com a sua aplicação dentro ou fora do corpo (*in vivo*, *in vitro*). Para aplicações *in vitro*, o objectivo é utilizar um método de separação, selecção e magnetorrelaxometria, enquanto para aplicações *in vivo*, este pode ser mais direccionado a nível terapêutico (hipertermia e fármaco-alvo) e na aplicação de diagnóstico (ressonância magnética nuclear (RMN)) [6].

Para aplicações *in vivo*, as nanopartículas magnéticas têm de ser encapsuladas com um polímero biocompatível durante ou depois do processo de preparação para prevenir alterações na estrutura original, na formação de grandes agregados, e a biodegradação quando exposta ao sistema biológico. O revestimento da NP com o polímero irá permitir a ligação de complexos/fármacos pela funcionalização nas partículas, por adsorção ou ligações covalentes [7]. Os principais factores que determinam a toxicidade e a biocompatibilidade destes materiais, são a natureza dos componentes responsáveis pela magnetização, tal como magnetite, ferro, níquel, e cobalto, bem como o tamanho final das partículas, o núcleo e o revestimento.

As nanopartículas de óxido de ferro, tal como a magnetite (Fe_3O_4) ou a sua forma oxidada magamite ($\gamma-Fe_2O_3$) são de longe as NP mais utilizadas para aplicações biomédicas, uma vez que tanto o cobalto como o níquel, por serem altamente magnéticas, são facilmente oxidadas e muito tóxicas, daí que tenham pouco interesse científico. A maior vantagem de usar partículas de tamanhos inferiores a 100 nm é a sua elevada área superficial efectiva, a baixa taxa de sedimentação e a elevada difusão celular [8]. Já existem no mercado companhias (*DYNAL Biotech*) que fabricam dispositivos como o representado na **Figura 2**, que utiliza NPM como transportadores de fármacos.

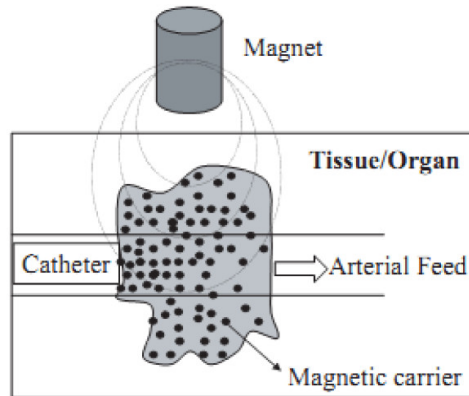


Figura 2. Representação esquemática do transporte accionado magneticamente de fármacos para uma região específica [8]. O cateter é inserido a numa via de alimentação arterial ao tumor, e um suporte magnético é posicionado no local alvo.

A molécula biológica/fármaco que se encontra fixada à camada superficial da NPM pode ser usada em células alvo específicas (p. ex. células tumorais) que podem assim ser aquecidas ou mortas por um campo magnético externo de radiofrequência fraca, que é inofensivo para o tecido saudável.

Este tema tem assim sido motivo de investigação em diferentes aplicações das NPM, principalmente a nível biomédico. Com base no historial científico o foco do estudo tem assim vindo a ser muito desenvolvido no que diz respeito a fármacos magnéticos alvo, em particular a entrega de ácidos nucleicos magneticamente guiados e avançados, também conhecido como magnetofecção [9]. Progressos consideráveis neste campo particular foram conseguidos durante a última década [10], tendo como exemplo disso a **Figura 3**.

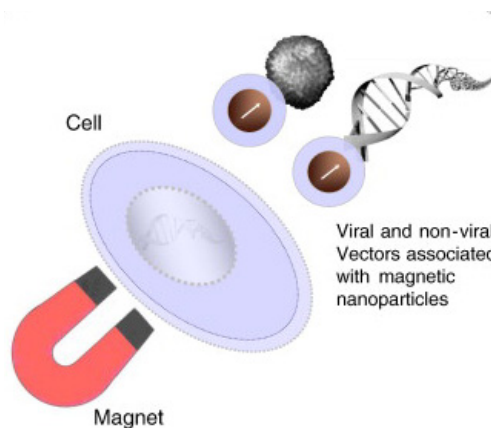


Figura 3. Princípio da magnetofecção [10]. Vectores de entrega de genes virais e não virais estão associados a NPM. A força magnética direcciona os vectores para as células alvo resultando numa rápida e eficiente entrega dos ácidos nucleicos.

Chorny *et al.* [11] focou-se na formulação e características das NPM baseadas no polilactídeo de modo a alcançar uma rápida internalização das NPM em células endoteliais também combinadas com a transdução adenoviral de NPM mediadas.

Nanopartículas de Sílica (NPS)

As nanopartículas de sílica (NPS) são um dos materiais mais interessantes no que diz respeito à sua fácil preparação e modificação superficial e não toxicidade [12]. Baseado nas suas variadas vantagens, as NPS têm sido muito estudadas e usadas em diversas áreas tais como a suporte sólido de materiais em colunas de cromatografia, camadas isolantes e compósitos de polímeros de sílica em diferentes campos da engenharia, bioimagemologia e sistema de transporte de fármaco/gene em nanobiotecnologia [13].

O tamanho das NPS afecta as suas propriedades físicas, químicas, eléctricas e ópticas. Sozinhas as NPS, com propriedades dependentes do tamanho puro, não são notáveis, contudo quando estas são combinadas com moléculas funcionais, o impacto do tamanho torna-se significativo, especialmente para aplicações em análise [14]. O papel das NPS nestes casos é usualmente de matriz de suporte ou encapsulação. As duas maiores razões que tornam a sílica numa matriz muito útil [15] a este respeito e uma relevância particular nas bioaplicações são:

1. A superfície das NPS é facilmente modificada. Com a superfície apropriada e funcionalidade interna, estas podem ser ligadas a uma variedade de agentes biológicos de diferentes maneiras (p. ex. anticorpos, complexos proteicos, ácidos nucleicos, entre outros);
2. A matriz de sílica carregada negativamente providencia por si mesma numerosos locais de ligação electrostáticos ao fármaco (p. ex. adsorção) carregado positivamente.

Outro tipo de NPS também muito utilizadas são as mesoporosas (NMS) desde 1992 [16] que se tem feito um estudo muito extensivo em relação à síntese, caracterização e aplicação destes materiais. Aplicações biomédicas tais como transporte de fármacos anticancerígenos, enzimas, e DNA são uma das mais promissoras porque explora a estrutura porosa das nanopartículas, a elevada área superficial e o volume considerável do poro. As NPS biomédicas ideais podem ser utilizadas simultaneamente em diagnóstico, imagiologia, e terapia.

O uso biomédico destes materiais NMS é dificultado tanto pela sua tendência a agregar quando exposto às condições fisiológicas e/ou, no seu global, pelo elevado tamanho da nanopartícula, com diâmetros de partículas que excedem os 150 nm [17]. O tamanho das NMS sintetizadas é crítico porque estudos demonstraram que partículas de sílica com diâmetros superiores a 100 nm são rapidamente sequestradas pelo sistema reticular endotelial, acumulando-se no fígado e no baço antes do fármaco chegar às células/tecido alvo, mas NPS mais pequenas (diâmetro < 50 nm) com uma modificação de PEG têm um decréscimo de sequestro pelos órgãos do sistema

reticular endotelial e exibem um maior tempo na circulação sanguínea [18]. Em geral, tamanhos mais pequenos fornecem uma maior área superficial/volume, melhor mobilidade e reactividade mais rápida do que tamanhos maiores [14].

Recentemente, o interesse tem gerado o uso de novas nanopartículas baseadas em sílica para imagiologia. Nanomateriais baseados em sílica como coloides, mesoporosos e nanopartículas de sílica modificadas organicamente (ORMOSIL), mostraram um potencial promissor em aplicações biotecnológicas, assim como, nanosondas para imagiologia alvo [19]. As nanopartículas de ORMOSIL são porosas e têm um tamanho de poro que pode ser ajustado, e assim conseguem incorporar moléculas bioactivas, como enzimas, material genético, e fármacos quimioterapêuticos. Estas podem também ser marcadas com péptidos específicos para uma função alvo, permitindo assim direccionar as nanopartículas de ORMOSIL a tipos de células ou tecidos específicos. Através da **Figura 4**, podemos ver as propriedades físico-químicas das nanopartículas de ORMOSIL.

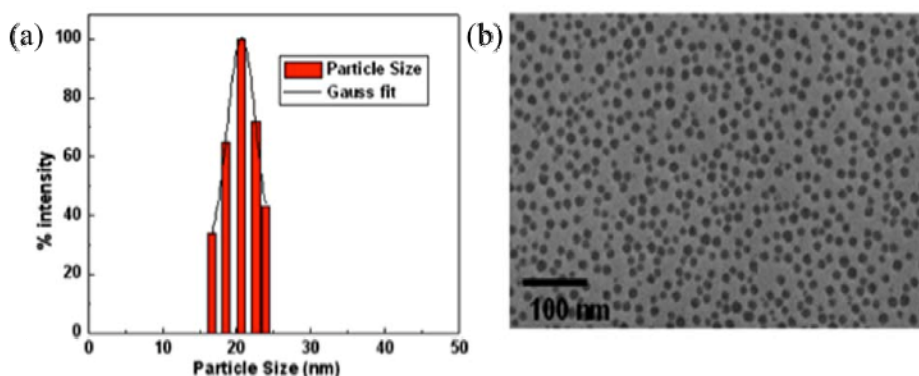


Figura 4. Propriedades físico-químicas das nanopartículas de ORMOSIL, adaptado de [20]. (a) Perfil de distribuição das nanopartículas de ORMOSIL, tendo um tamanho médio de 20 nm; (b) Imagem de TEM das nanopartículas.

As nanopartículas de ORMOSIL mostraram-se muito promissoras no desenvolvimento de aplicações terapêuticas em doenças neuronais humanas em que são usadas por um longo período de tempo dentro dos organismos inteiros. Estas apresentam características não tóxicas e capacidade para se incorporar rapidamente em tecidos neuronais, uma vez que vivem em conjunto com a sua superfície porosa, o que permite a incorporação de moléculas específicas para o direccionamento [20]. Já foram realizadas transfecções mediadas pelas nanopartículas de ORMOSIL para manipular a biologia de células estaminais neuronais *in vivo*. Os resultados desta aproximação nanomédica como plataforma de entrega de genes não virais, mostrou-se promissora para a modelação eficaz da doença e manipulação terapêutica no cérebro adulto [21].

1.1.2 Funcionalização de Nanopartículas

Depois de abordar todas as nanopartículas de uma forma geral e de modo a dar continuidade ao trabalho que muitos investigadores têm feito recentemente, não podia deixar de se falar da funcionalização das mesmas. Um desenvolvimento significativo centra-se nas aplicações baseadas dos nanomateriais, sendo o desenvolvimento de nanopartículas funcionalizadas, a base mais importante para o uso em áreas como as ciências farmacêuticas e biomédicas [22]. Os primeiros resultados clínicos sugeriram que a funcionalização de nanopartículas com moléculas específicas de reconhecimento torna as nanopartículas multifuncionais e com uma eficácia melhorada, enquanto simultaneamente reduz os efeitos secundários, devido às suas propriedades de localização do alvo em tumores e incorporação celular activa. Alguns desses casos já foram abordados acima.

Tanto as nanopartículas magnéticas como as de sílica são passíveis de serem funcionalizadas, como todos os outros tipos de nanopartículas como se pode evidenciar na **Figura 5**.

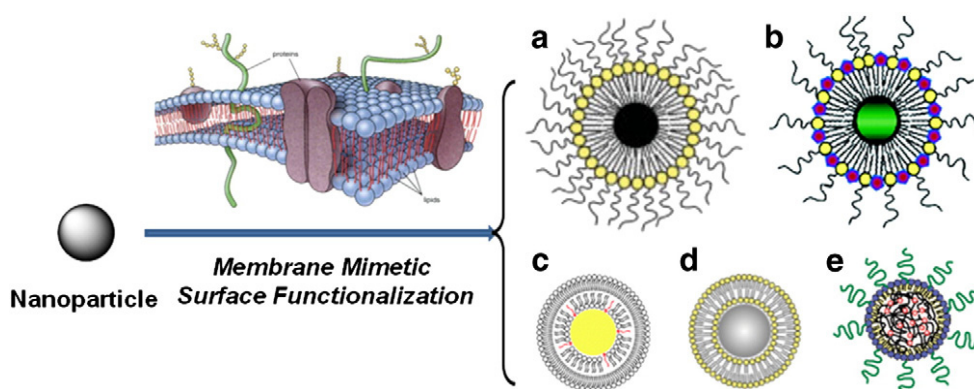


Figura 5. Representação esquemática do típico sistema mimético de membrana com a superfície de nanopartículas funcionalizada [23]. (a) Nanopartícula magnética (NPM); (b) *Quantum dot*; (c) Nanopartícula de ouro; (d) Nanopartícula de sílica (NPS) e (e) Nanopartícula polimérica.

As NP quando dopadas com moléculas de corante, tornam-se reagentes intensamente luminescentes capazes de fazer uma sinalização sensível a alvos biológicos. Utilizando NP fluorescentes bioconjugadas, desenvolveram-se métodos ultrasensíveis para biotestes (p. ex. detecção de bactérias) [24]. Quando dopadas com moléculas bioactivas e médicas, estas NP podem servir também como veículos de transporte para fármacos capazes de controlar a quantidade e o tempo de libertação. Recentemente foi descoberto que as NPS inorgânicas densas, que por elas mesmas não fazem o transporte de DNA, são capazes de melhorar a transfecção de DNA, normalmente mediada por outros reagentes de transfecção [25]. A superfície das NP

pode ser modificada por outros reagentes (p. ex. organo-silanos) e assim outros componentes adicionais podem ser acoplados facilmente.

Também as nanopartículas de ORMOSIL já foram anteriormente conjugadas com fluoróforos e ligandos alvo, e foram utilizadas em imagiologia óptica em células tumorais *in vitro* [26]. Estas partículas foram também testadas, para potencial uso, em terapia fotodinâmica, e como sondas ópticas direccionadas para imagiologia em experiências *in vitro* de células pancreáticas cancerígenas [27,28].

1.2 Lantanídeos

Os elementos químicos lantanídeos compreendem os quinze elementos químicos com os números atômicos do 57 ao 71, desde o Lutécio (Lu) ao Lantânio (La). Estes quinze elementos lantanídeos, juntamente com os elementos quimicamente semelhantes escândio e ítrio, são muitas vezes conhecidos como os elementos raros da terra. O símbolo químico informal usado para abordar qualquer um dos lantanídeos é Ln [29]. Todos os lantanídeos, menos um, pertencem ao bloco f, que correspondem ao preenchimento electrónico da orbital 4f, o Lu que é um elemento do bloco d, mas é geralmente considerado um lantanídeo devido às suas semelhanças químicas com os outros catorze. Todos os lantanídeos formam catiões trivalentes, Ln^{3+} , cuja composição química é largamente determinada pelo raio iónico, o que diminui progressivamente do lantânio para o lutécio [30], que é explicado devido à contracção que tem origem no aumento do número de prótons presentes no núcleo do átomo.

Os lantanídeos apresentam uma química rica em fotofísica e coordenação com importantes aplicações em biologia e medicina que permanece subvalorizada por muitos investigadores. O renascimento e a crescente importância na investigação de materiais e biologia, foi assinalado num elevado número de revisões recentes [31].

Inicialmente os lantanídeos foram utilizados como reagentes de desvios em RMN para simplificar a análise espectral de compostos orgânicos quirais [32]. Esta aplicação estendeu-se rapidamente para a biologia estrutural, onde os metais paramagnéticos provaram ser muito úteis na determinação de estruturas proteicas, tanto por RMN como por cristalografia de Raios-X [33]. Depois destas aplicações os lantanídeos passaram a ser utilizados como reagentes de deslocamento para espectroscopia de ressonância magnética e agentes de contraste para imagiologia de ressonância magnética (MRI) [34], tendo também sido encontrados mais alguns usos para vários complexos de lantanídeos como agentes terapêuticos, em medicina.

As características espectroscópicas destes elementos, essenciais na descoberta de alguns membros desta família, provêm do facto da orbital 4f estar protegida pelas orbitais preenchidas $5p^6$ e $6s^2$, o que permite transições electrónicas proibidas 4f-4f pelas leis da quântica, tendo coeficientes de absorção molar muito baixas e emissão na região do visível e do infravermelho próximo [35], sendo um grupo muito particular em termos de luminescência.

A luminescência é o processo no qual as espécies absorvem a luz a um comprimento de onda e emitem a outro, geralmente mais elevado. A energia absorvida excita a molécula do seu estado fundamental no nível electrónico singuleto (S_0) para um nível mais elevado (S_1 , S_2 , etc.) [36], como demonstrado na **Figura 6**.

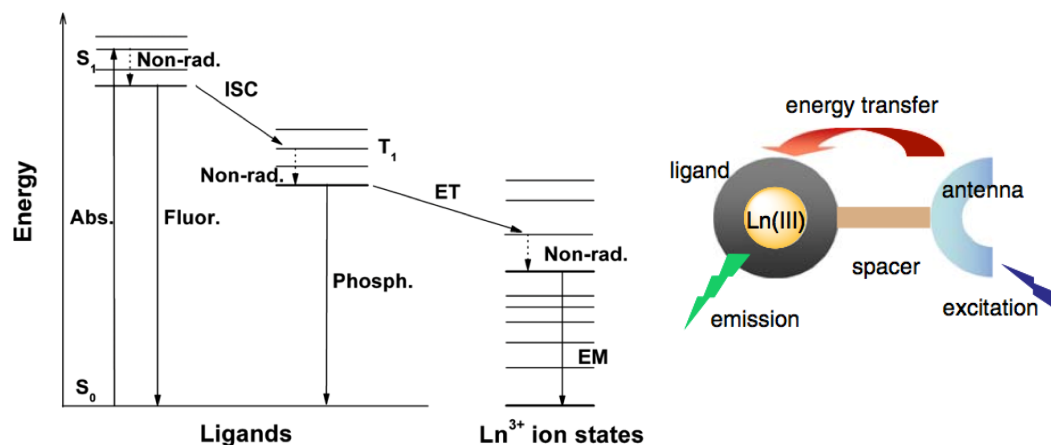


Figura 6. Processo de luminescência de emissão dos Lantanídeos em geral pelo “efeito de antena”, adaptado de [37, 38]. À esquerda está um diagrama de Jablonski simplificado mostrando os fluxos de energia durante a luminescência dos lantanídeos através da sua antena e à direita representa-se a excitação indirecta de um Ln por via de uma antena.

Vários estudos demonstram que o rendimento dos materiais com lantanídeos não é tão alto como o esperado teoricamente [39]. O motivo para esta falha em termos de rendimento prende-se com as transições energéticas f-f de carácter proibido, que como já foi dito anteriormente, permitem a emissão de luz excepcionalmente num único elemento [40]. O facto destas, transições serem proibidas, faz com que após a absorção de luz na forma de energia, a emissão seja retardada, levando a tempos de decaimento longos, mas provoca também uma perda de energia, daí que o rendimento dos lantanídeos (Ln) em materiais não seja o esperado.

Para ultrapassar esta extinção de fluorescência que não era esperada, desenvolveu-se um método que é conhecido por “efeito de antena” [37-38]. Este efeito consiste na transferência de energia entre um ligando orgânico e o Ln, que irá potenciar as propriedades luminescentes do mesmo, daí que seja como que uma antena que capta a luz [41]. Como os lantanídeos são ricos em química de coordenação, o método utilizado consiste em complexar o Ln com moléculas orgânicas que sejam eficientes na absorção de luz e na transferência de energia para os níveis do Ln, sendo por isso mais eficiente a presença de “antenas” com níveis de energia próximos dos do íon [42].

O papel da antena (**Figura 6**) é absorver a energia da radiação UV-Visível e transferi-la para o íon lantanídeo. Primeiro a antena é excitada do estado fundamental para o estado singuleto excitado (S_1). As moléculas excitadas que atingem níveis de energia singuletos superiores (S_2 , etc) rapidamente ($\sim 10^{-10}$ s) regressam ao nível excitado

mais baixo S_1 (Conversão interna, $S_2 \rightarrow S_1$) sem emissão de luz, a partir do qual um certo número de radiação (*fluorescência*) e transições não-radiativas podem ocorrer para que a molécula volte para qualquer um dos níveis de rotação e/ou vibração do estado fundamental electrónico S_0 . Seguidamente, ocorre transição do S_1 para o estado tripleto T_1 , ou seja, conversão inter-sistemas (ISC) e pode ser seguido de relaxação para S_0 por um processo radiativo (*fosforescência*) ou não-radiativo [43]. Também ocorre transferência de energia intramolecular (ET) da antena para o estado excitado do Ln. Assim o Ln emite uma luz no visível, por exemplo a 545 nm para o Tb e 611 a 618 nm para o Eu [37].

A escolha do Ln a utilizar para processos luminescentes prende-se com aquele que é mais eficiente na emissão, isto é, traduz-se naquele que consegue ter um nível excitado mais facilmente ocupado e que consegue minimizar as perdas de energia. Os mais utilizados a nível de sondas fluorescentes têm sido o Európio (Eu), o Gadolínio (Gd) e Térbio (Tb), pois apresentam valores de rendimento quântico intrínseco mais elevados [35].

Neste trabalho vamos focar-nos especialmente num elemento em particular o Európio.

1.2.1 Európio

O Európio (Eu, $Z = 63$, $[\text{Xe}] 4f^7 6s^2$) foi descoberto em 1901 por Eugène-Anatole Demarçay, que após realizar uma sequência cuidadosa de cristalizações de samário nitrato de magnésio, separou mais um novo elemento. Sendo um elemento típico da série dos lantanídeos, geralmente assume o estado de oxidação +3, mas o estado de oxidação +2 também é comum: todos os compostos de európio com o estado de oxidação 2 são ligeiramente redutores. Este não tem um papel biológico importante e é relativamente não-tóxico em comparação com outros metais pesados. A maioria das aplicações do európio explora a fosforescência deste composto [44]. O Eu^{3+} tem sido preferido como dopante para otimizar a intensidade da emissão vermelha em imagiologia celular [45], que acompanha a explicação da sua propriedade única de fotoluminescência.

Apesar deste, elemento não ter um papel biológico activo, cada vez mais se tem tornado num potencial fluoróforo, pois apresenta uma elevada eficiência fotoluminescente, estabilidade e rendimento quântico intrínseco, e é termicamente estável [46].

A maior parte dos trabalhos publicados são focados nos complexos emissivos de Eu(III), porque o estado de excitação deste ião é menos sensível ao “*quenching*” vibracional pela energia de transferência dos osciladores OH, NH, ou CH [47].

Todas as características referidas dos lantanídeos, em específico do Eu, têm levado diversos autores a testar diversas aplicações para os mesmos, tais como, sensores em imunofluorescência [48], aparelhos ópticos electrónicos [49], biosensores, marcadores de imagiologia [50] e ainda amplificadores de fibras [51].

De todas estas aplicações a que desperta mais interesse a nível bioquímico e biomédico são sem dúvida as biosondas para uso em imagiologia e transfecções.

1.3 Biosondas Fluorescentes

As sondas baseadas em lantanídeos são a nova tendência nesta área sendo que, na última década viu-se o surgimento das primeiras sondas luminescentes de lantanídeos que foram sensíveis especificamente em processos de imagiologia celular. O potencial destas sondas ainda é um pouco subvalorizado pela comunidade científica [37].

Os complexos de lantanídeos (III) têm propriedades atractivas como sondas ópticas. Eles possuem grandes desvios de Stokes (grande separação entre os comprimentos de onda de absorção e emissão) e longos tempos de semivida de emissão (entre 1 μ s a 5 ms) o que permite o uso de métodos de aquisição dependentes do tempo para melhorar a razão sinal/ruído, minimizando a interferência da dispersão de luz ou autofluorescência [52, 53].

Apesar dos princípios por trás dos lantanídeos e dos sensores baseados em metais de transição serem diferentes, independentemente do metal escolhido, uma sonda celular baseada num metal deve satisfazer diversos requisitos: 1. elevada selectividade para o substrato alvo; 2. ligação reversível do substrato para medições em tempo real; 3. solubilidade em água; 4. eficácia em meios biológicos relevantes; 5. Elevada estabilidade termodinâmica e cinética do sensor baseado no metal; 6. Baixa toxicidade; 7. Elevada permeabilidade celular [37].

As biosondas estudadas até agora mostraram ter três classes de localização principais de acordo com o seu comportamento, lisossomal, mitocondrial e manchas nos nucléolos. O perfil de localização padrão pode ser chamado endossomal-lisossomal [54] e é exibido por 80% dos complexos, as taxas de absorção e saída são rápidas e normalmente não tóxicas. A segunda classe de complexos revela uma rápida absorção, mas uma saída lenta e a localização envolve uma oscilação entre o mitocôndrio e os compartimentos endossomais/lisossomais. Complexos que permaneçam no mitocôndrio por mais de 6-10 h revelam baixos valores de IC_{50} e facilmente induzem a morte de células apoptóticas [55]. A terceira classe dos complexos mancha os ribossomas com proteínas densas e os nucléolos das células [56], e têm uma absorção e uma saída relativamente lenta. Pode-se observar a representação esquemática na **Figura 7**.

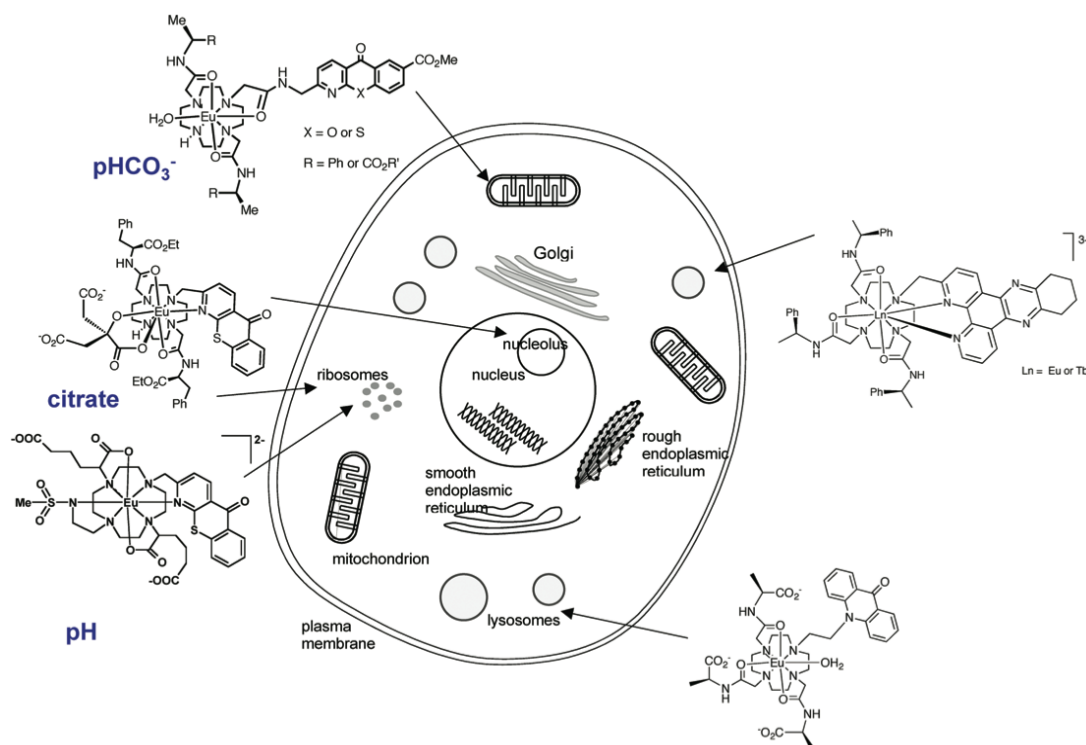


Figura 7. Ilustração esquemática dos perfis de localização intracelular dominantes dos complexos macrocíclicos de Eu e Tb [57].

A estratégia de muitos investigadores foi assim combinar o potencial dos complexos de lantanídeos com as propriedades das NP, surgindo assim duas formas de utilizar sondas na Biociência, como biosondas imagiológicas em MRI e como transportador de fármacos.

Uma sonda que combine a fluorescência e a ressonância magnética resolve tanto a resolução com a profundidade da imagiologia [58] e providencia uma ferramenta de diagnóstico para estudos *in vitro* e *in vivo*, o que leva a um melhoramento na visualização de materiais biológicos e uma maior credibilidade dos dados recolhidos. Estas sondas *bimodais* são exploradas na marcação biológica, em intervenções terapêuticas fotodinâmicas, alvos para tumores e transportadores de fármacos [59]. As sondas *bimodais* com uma elevada performance e boa biocompatibilidade têm despertado o interesse dos investigadores [60].

Uma abordagem atraente para aumentar a intensidade do sinal de luminescência do lantanídeo é colocar uma elevada quantidade de complexos de lantanídeos luminescentes em nanopartículas, que são então utilizados como um rótulo num ensaio de afinidade (**Figura 8**). A maioria das nanopartículas comercialmente disponíveis têm até agora contido Eu(III)/quelatos β -dicetonato com uma tampa de poliestireno, exibindo propriedades espectroscópicas similares aos complexos livres em solução [42].

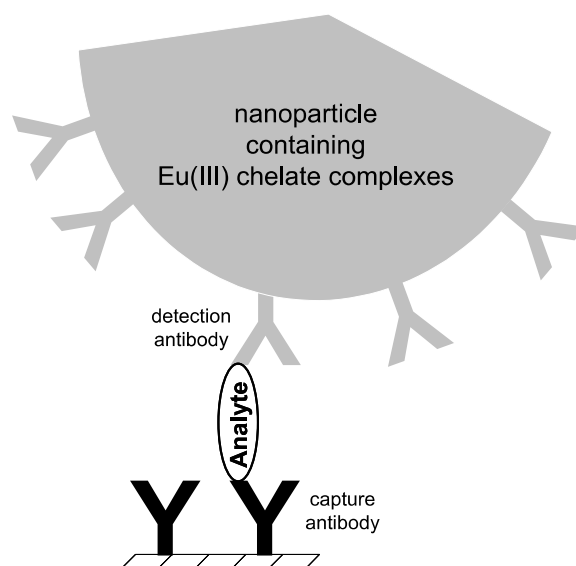


Figura 8. Princípio de um imuno-ensaio utilizando nanopartículas contendo quelatos de Eu(III) [42].

Neste trabalho o principal objectivo foi criar novas Biosondas imagiológicas partindo de nanopartículas de Ferro, contrariamente ao que muitos investigadores têm feito que utilizam o Gadolínio, como agente de contraste utilizado actualmente em MRI. Tem sido sugerido que os agentes de contraste baseados em Gd extracelulares podem ter uma relação de causa com a Fibrose Sistémica Nefrogénica (NSF) [61]. A NSF foi descrita pela primeira vez em 1997, em pacientes com doença renal em estado terminal [62]. É caracterizada por alterações cutâneas que afectam principalmente os membros e tronco. As alterações fibróticas também podem afetar outros órgãos como músculos, coração, fígado e pulmões [62]. A doença pode ser agressiva em alguns pacientes, levando a uma deficiência física grave ou até mesmo à morte.

1.3.1 Imagiologia de Ressonância Magnética

Numerosas estratégias têm vindo a ser desenvolvidas para a imagiologia celular [63, 64]. Técnicas de imagiologia não invasivas, como a imagiologia de ressonância magnética (MRI) parecem ser adequadas desde que consigam actuar em tecidos sensíveis e em células em tempo real. Quando se utilizam agentes de contraste altamente paramagnéticos, esta técnica permite um levado contraste assim como uma resolução espacial [65, 66].

Quando se aborda este tema é necessário ter em mente determinados conceitos como é o caso de relaxação e taxa de relaxamento das partículas magnéticas.

A relaxação (r_1 , r_2) mede a capacidade de qualquer partícula magnética influenciar o tempo de relaxamento longitudinal (T_1 , r_1) ou tempo de relaxamento transversal (T_2 , r_2) ou ambos dos spins dos protões da água circundante. É medida *in vitro* e representa o reforço de relaxamento dos protões da água pelo agente de contraste a uma

concentração de 1 mM [67]. Nas aplicações de diagnóstico de ressonância magnética, a relaxação é medida de modo a obter mais informação sobre a ligação entre as NP funcionalizadas e o material biológico. As taxas de relaxamento R_1 e R_2 são quantitativas, e derivam da relaxação longitudinal (T_1) e transversal (T_2) [68].

Actualmente muitos investigadores têm mostrado muito interesse no Gd ou Eu combinado com o enxofre devido às propriedades magnética-óptica intrínsecas de semi-condutor magnético e de luminescência [69,70]. Vários trabalhos publicados recentemente, apresentam a síntese de nanopartículas de gadolínio juntamente com sulfureto de európio (GdS:Eu^{3+}) [71] ou de óxido de gadolínio juntamente com iões de európio ($\text{Gd}_2\text{O}_3\text{:Eu}^{3+}$) [72, 73]. Outros trabalhos já apresentam NP bifuncionais que combinam a componente magnética e luminescente ($\text{Fe}_3\text{O}_4@\text{Gd}_2\text{O}_3\text{:Eu}^{3+}$) [74], em que o interior é de ferro e a camada superficial é de Gd e Eu.

Weissleder *et al.* [75] estudou a visualização de células migradoras tal como os linfócitos, monócitos e células estaminais embrionárias com NPM através de MRI (**Figura 9**). Eles perceberam que a taxa de relaxamento R_2 aumenta com a internalização das NPM nas células, comparativamente a estas sozinhas em solução.

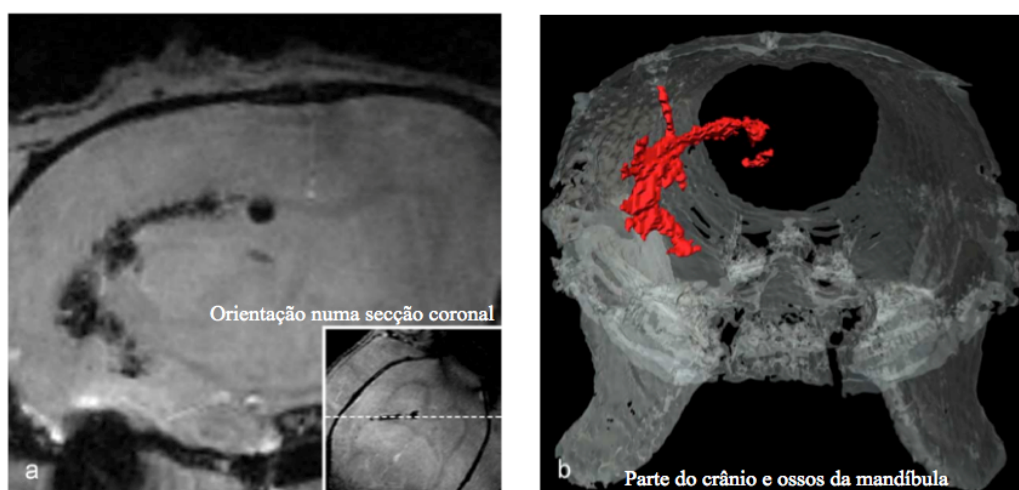


Figura 9. Transplantação de pequenas NP super-paramagnéticas de óxido de ferro marcadas nas células estaminais no cérebro de um rato. (a) Imagem da ressonância magnética através do cérebro. As células são observadas como uma área escura; (b) Processamento das células estaminais (vermelho) no cérebro, adaptado de [76].

Podemos assim concluir que as NPM são sintetizadas facilmente e providenciam a base para diferentes aplicações. Devido ao seu comportamento magnético estas têm provado ser excelentes agentes de contraste e estão a ser feitos estudos para melhorar a sua especificidade em determinados alvos. Com a ajuda das mesmas poderá vir a ser possível a detecção de algumas doenças como doenças inflamatórias (a nível cardiovascular, esclerose múltipla, arterioesclerose ou infecções) ou cancerígenas num estado primário ou para monitorizar o seu desenvolvimento [68]. Contudo, a síntese e funcionalização de NPM com lantanídeos está ainda no princípio de muito trabalho.

1.3.2 Nanopartículas de sílica luminescentes

As nanopartículas de sílica (NPS) luminescentes são materiais adequados à produção de marcadores brilhantes, que são de grande interesse em imagiologia e em particular em diagnósticos médicos para metodologias que incluem histologia e citometria de fluxo [77].

Estas nanopartículas luminescentes podem assim ser vistas como uma plataforma muito promissora para obter sistemas fluorescentes que apresentam funções importantes e complexas em todas as aplicações de técnicas baseadas em luminescência. Em particular, as NPS luminescentes podem apresentar uma monodispersão elevada, estabilidade e solubilidade em soluções aquosas, mesmo em condições fisiológicas combinando com a baixa toxicidade intrínseca das mesmas [78].

Todas estas premissas tornam as NPS plataformas únicas na área da nanotecnologia. As NPS luminescentes são já um foco de competição em muitas aplicações, sendo as mais comuns corantes comerciais, incluindo proteínas fluorescentes e *quantum dots*.

1.4 Objectivo do Trabalho

Trabalhos anteriores mostraram que cada vez mais se tentam conceber novas biosondas fluorescentes, utilizando lantanídeos. Como ficou perceptível as NP são um dos materiais com um futuro promissor tanto a nível imagiológico como ao nível de transporte de fármacos, duas das aplicações mais promissoras.

Partindo destes resultados tão promissores, o presente trabalho teve como principal objectivo sintetizar nanopartículas de ferro (NP-Fe) e de sílica (NPS) que foram posteriormente funcionalizadas na sua superfície com vista à preparação de biosondas, no caso das NP-Fe magneto-fluorescentes e para as NPS fluorescentes. O cerne das NP-Fe é inactivo, mas apresentam uma importante propriedade, o magnetismo, permitindo assim que as partículas possam ser direccionadas para onde se pretende, para aplicações em imagiologia como agentes de contraste. As NP-Fe e as NPS (sem magnetismo), funcionam também como sondas fluorescentes, recorrendo à sua funcionalização com um complexo de Európio (Eu) como agente promotor de fluorescência, ancorado com ligandos com anéis aromáticos condensados que melhoram a fluorescência, neste trabalho foi estudada em particular a fenantrolina. Depois de devidamente sintetizadas, todas as NP funcionalizadas foram caracterizadas pelas técnicas mais comuns de estado sólido; em seguida foram então realizados testes de fluorescência e de viabilidade celular. Estes testes foram realizados para se averiguar a potencial aplicação em imagem médica.

O teste colorimétrico do MTT (Brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio), foi utilizado para estudar a actividade citotóxica *in vitro* das NP sintetizadas e funcionalizadas em duas linhas celulares. Este estudo foi muito

importante pois só depois de realizado se poderá avançar com todo o restante estudo, de modo a utilizar as NP como biosondas.

CAPÍTULO 2

Procedimento **Experimental**

Procedimento Experimental

2.1 Materiais e instrumentos

Todos os materiais utilizados neste trabalho foram adquiridos nos fornecedores químicos habituais.

Os solventes foram secos sob atmosfera azoto utilizando os procedimentos comuns. O diclorometano foi destilado com CaH_2 e o etanol com CaO . As sínteses dos complexos e das NP-Fe foram realizadas sob atmosfera inerte, nomeadamente, azoto, utilizando as técnicas tradicionais de linha de vácuo/azoto e de *schlenk*.

Os estudos de análise elementar foram realizados no C.A.C.T.I, Universidade de Vigo, Espanha. Os restantes instrumentos estão descritos nas técnicas de caracterização.

As linhas celulares foram mantidas numa incubadora a 37 °C, numa atmosfera altamente humidificada com 95% ar da atmosfera/ 5% CO_2 (*Shellab CO₂ Series Sheldon Mfg. Inc.*). Todos os procedimentos em que foi necessário manusear as células foram feitos numa câmara de fluxo laminar (*ESCO Class II Biohazard Safety Cabinet*), com condições esterilizadas, assim como todo o material usado na cultura de células. Para os testes citotóxicos a absorvência foi medida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas de 96 poços (*Tecan Sunrise Absorbance Reader*).

2.2 Síntese dos Complexos

Complexo de Fenantrolina e Európio (1:1) (C0)

Dissolveu-se em etanol (10 mL) 1 mmol de fenantrolina (0.1983 g). Dissolveu-se o $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol, 0.3663 g) em água Milli-Q (10 mL) a 50 °C e em seguida adicionou-se, gota a gota, à solução de fenantrolina. A reacção ficou sob agitação a 50 °C durante aproximadamente 2 h.

No fim do tempo de reacção a solução foi evaporada a vácuo e em seguida foi lavado com etanol de forma a remover algum ligando que não tenha reagido e por fim secou-se a vácuo, durante aproximadamente 4 h. ($\eta = 95.4\%$, $m_{\text{obt}} = 0.470$ g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3400 (FF), 3170 (f), 1620 (F), 1400 (m), 1100 (f), 840 (f), 717 (f)

Complexo de Fenantrolina e Európio (2:1) (C1)

Dissolveu-se em etanol (10 mL) 2 mmol de fenantrolina (0.3966 g). Dissolveu-se o $\text{EuCl}_3 \cdot 6\text{H}_2\text{O}$ (1 mmol, 0.3663 g) em água Milli-Q (10 mL) a 50 °C e em seguida adicionou-se, gota a gota, à solução de fenantrolina que ficou sob agitação a 50 °C durante aproximadamente 2 h.

No fim do tempo de reacção a solução foi evaporada a vácuo e em seguida foi lavada de novo com etanol de forma a remover algum ligando que não tenha reagido e por fim secou-se a vácuo, durante aproximadamente 4 h. ($\eta \approx 100\%$, $m_{\text{obt}} = 0.648$ g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3400 (FF), 3200 (f), 1620 (F), 1517 (m), 1400 (F), 1142 (m), 1100 (m), 780 (f), 728 (m), 630 (m)

Complexo de Fenantrolina e Európio (2:1) com adição do ligando 3-APTS (C2)

Dissolveu-se o complexo C1 (6.26×10^{-4} mol, 0.4 g) em 10 mL de etanol e em seguida uma solução de 3-aminopropiltrimetoxissilano (6.26×10^{-4} mol, 109 μL).

Deixou-se a reacção em agitação durante a noite à T_{amb} e por fim a solução foi seca a vácuo durante várias horas. ($\eta = 93.1\%$, $m_{\text{obt}} = 0.465$ g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3389 (FF), 3100 (f), 1617 (m), 1517 (m), 1420 (F), 1370 (f), 1200 (f), 1085 (m), 843 (F), 728 (F), 618 (f)

2.3 Síntese das Nanopartículas

Nanopartículas de Ferro (NP-Fe) [79]

Cloreto de ferro (II) (FeCl_2 , 2.5 g) e cloreto de ferro (III) (FeCl_3 , 5 g) foram adicionados a 200 mL de 2-propanol destilado sob agitação, formando uma solução laranja-amarelada.

Após 15 min de agitação, aumentou-se a temperatura para 80 °C e adicionaram-se 100 mL de hidróxido de amónia (NH_4OH). A solução ficou castanha escura e manteve-se em agitação durante 2 h, em atmosfera inerte. Ao fim deste tempo as nanopartículas foram protegidas com a adição de 10 mM de ácido oleico em 300 mL de metanol. Foram removidas da solução por centrifugação (10 min, 3000 rpm), lavadas com metanol e redispersas em etanol. ($\eta = 50\%$, $m_{\text{obt}} = 4.416$ g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3400 (FF), 3133 (FF), 1617 (F), 1400 (FF), 1200 (f), 1072 (F), 565 (m)

Revestimento de sílica às Nanopartículas de Ferro utilizando ultra-sonicação (NP-Fe-Si_{US}) [80]

Foram preparadas duas soluções:

Solução A: Adicionou-se 1 g de NP-Fe a 100 mL de etanol, 60 mL de água destilada e 0.6 mL de amónia, num balão de 2 tubuladuras e colocou-se no banho de ultra-sons durante 1 h à temperatura ambiente ($T_{\text{amb}} \approx 25$ °C)

Solução B: Adicionou-se 16.67 mL de tetraetilortossilicato (TEOS) a 40 mL de etanol sob agitação durante 10 min.

A solução B foi então adicionada à solução A, a uma taxa de 0.5 mL/min. A mistura foi deixada durante 12 h no banho de ultra-sons à T_{amb} . Após este tempo a reacção foi centrifugada (10 min, 3000 rpm) e lavada 5 vezes repetidamente com etanol e água destilada. Deixou-se secar na estufa a 60 °C e depois a vácuo durante algumas horas.

($\eta = 70.3\%$, $m_{obt} = 2.348$ g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3400 (FF), 3191 (f), 2021 (f), 1617 (F), 1400 (F), 1216 (f), 1083 (F), 543 (m)

Nanopartículas de sílica (NPS) e (NPSg) [12]

Adicionou-se 6 mL de TEOS, com 30 mL de amónia e 10 mL de água Milli-Q numa mistura de solvente alcoólico (metanol:etanol (10:0), mantendo o volume final de 500 mL).

A reacção foi deixada em agitação a uma velocidade de 400 rpm durante 12 h à T_{amb} . Por fim as SNP foram depois lavadas 3 vezes com etanol através da centrifugação-redispersão a 10 000 rpm. ($\eta \approx 80\%$, $m_{obt} = 0.1806$ g)

De modo a obter uma maior quantidade o procedimento foi o mesmo, mas de maneira proporcional alteraram-se as quantidades para 60 mL de TEOS, 200 mL NH_3 e 100 mL de água Milli-Q, obtendo-se nanopartículas com um maior diâmetro (**NPSg**). ($\eta \approx 90\%$, $m_{obt} = 17.238$ g)

(**NPS**) IV (KBr ν/cm^{-1}): 3390 (F), 3112 (FF), 2034 (f), 1617 (m), 1398 (FF), 1193 (f), 1090 (FF), 939 (f), 750 (f)

(**NPSg**) IV (KBr ν/cm^{-1}): 3390 (F), 3112 (FF), 2034 (f), 1617 (m), 1398 (FF), 1193 (f), 1090 (FF), 939 (f), 750 (f)

2.3.1 Reacção das Nanopartículas de Ferro com os Complexos

NP-Fe-Si_{US} com 3-aminopropiltrimetoxissilano (NP-Fe-3-APTS)

Foi adicionado a 1 g de NP-Fe-Si_{US} 30 mL de tolueno e 2 mL de 3-aminopropiltrimetoxissilano (3-APTS).

Esta reacção foi deixada em refluxo durante 24 h. Por fim as NP-Fe+Si_{US} foram separadas por centrifugação (3 000 rpm, 10 min) e secas na estufa a 60 °C durante várias horas. ($\eta \approx 100\%$, $m_{obt} = 0.986$ g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3400 (FF), 3116 (FF), 2000 (f), 1617 (m), 1400 (F), 1220 (f), 1081 (FF), 760 (f), 586 (m)

NP-Fe+Si_{US} com 3-aminopropiltrimetoxissilano com o complexo de Fenantrolina e Európio (2:1) (NP-FeC1)

Foram adicionados 0.35 g do complexo C1 (0.55 mmol) a uma solução de etanol (40 mL) que ficou sob agitação durante 15 min, a 50 °C.

Em seguida, esta solução foi adicionada, gota a gota, a uma suspensão aquosa do material NP-Fe-3-APTS (0.35 g). A mistura foi deixada em agitação durante 24 h, em refluxo.

O sólido obtido foi separado por centrifugação (3 000 rpm, 10 min) e lavado várias vezes com etanol e seco a vácuo durante várias horas. (η = 94.15%, m_{obt} = 0.329 g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3361 (f), 3112 (FF), 1617 (m), 1400 (F), 1218 (f), 1085 (FF), 937 (f), 790 (m), 551 (f)

NP-Fe+Si_{US} com o complexo de Európio e Fenantrolina (1:2) com adição do ligando 3-Aminopropiltrimetoxissilano (NP-FeC2)

Foram adicionados 0.44 g do complexo C2 (0.55 mmol) a uma solução de etanol (50 mL) que ficou sob agitação durante 15 min, a 50 °C.

Em seguida, esta solução foi adicionada, gota a gota, a uma suspensão aquosa do material NP-Fe-Si_{US} (0.35 g). A mistura foi deixada em agitação durante 24 h, em refluxo.

O sólido obtido foi separado por centrifugação (3 000 rpm, 10 min) e lavado várias vezes com etanol e seco a vácuo durante várias horas. (η = 82.1%, m_{obt} = 0.426 g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3400 (F), 3114 (FF), 1594 (m), 1400 (F), 1243 (f), 1064 (FF), 998 (f), 809 (f), 601 (m)

Análise elementar: 1.74 %N, 7.61 %C, 1.30 %H e 6.71 %Eu

2.3.2 Reacção das Nanopartículas de Sílica com os Complexos

NPS com 3-aminopropiltrimetoxissilano (NPS-3-APTS)

Adicionou-se a 1 g de NPS, 30 mL de tolueno e 2 mL de 3-aminopropiltrimetoxissilano (3-APTS). Esta reacção foi deixada em refluxo durante 24 h e em seguida foi separada por centrifugação (10 000 rpm, 10 min) e por fim foi seca a vácuo durante várias horas. (η \approx 100%, m_{obt} = 1.027 g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3345 (f), 3112 (FF), 1845 (f), 1604 (m), 1398 (F), 1105 (FF), 937 (f), 784 (m)

Procedeu-se da mesma forma, mas com as NPSg, obtendo o material NPSg-3-APTS que contém as mesmas bandas de IV. (η \approx 100%, m_{obt} = 1.031 g)

NPS com 3-Aminopropiltrimetoxissilano com o complexo de Európio e Fenantrolina (1:2) (NPSC1)

Preparou-se uma solução do complexo C1 (0.35 g, 0.55 mmol) em etanol (40 mL) que ficou sob agitação durante 15 min, a 50 °C.

Em seguida, adicionou-se esta solução, gota a gota, a uma suspensão aquosa do material NPS-3-APTS (0.35 g). A mistura ficou em agitação durante 48 h, em refluxo. O sólido obtido foi separado por centrifugação (10 000 rpm, 10 min) e lavado várias vezes com etanol e seco a vácuo durante várias horas. ($\eta = 91.1\%$, $m_{\text{obt}} = 0.384$ g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3376 (F), 3116 (F), 2017 (f), 1617 (m), 1396 (m), 1093 (FF), 937 (m), 790 (m)

Análise Elementar: 1.05 %N, 6.12 %C, 1.61 %H e 3.15 %Eu

Procedeu-se da mesma forma, mas com as NPSg-3-APTS como base, obtendo o material NPSgC1 que contém as mesmas bandas de IV ($\eta = 90.2\%$, $m_{\text{obt}} = 0.367$ g).

NPS com o complexo de Európio e Fenantrolina (1:2) com adição do ligando 3-Aminopropiltrimetoxissilano (NPSC2)

Preparou-se uma solução do complexo C2 (0.441 g, 0.55 mmol) em etanol (50 mL) que ficou sob agitação durante 15 min, a 50 °C.

Em seguida, adicionou-se esta solução, gota a gota, a uma suspensão aquosa do material NPS (0.35 g). A mistura ficou em agitação durante 48 h, em refluxo.

O sólido obtido foi separado por centrifugação (10 000 rpm, 10 min) e lavado várias vezes com etanol e seco a vácuo durante várias horas. ($\eta=94\%$, $m_{\text{obt}}=0.372$ g)

IV (KBr ν/cm^{-1}): 3390 (FF), 3118 (F), 2000 (f), 1617 (m), 1488 (f), 1400 (FF), 1193 (f), 1095 (FF), 939 (f), 790 (f), 557 (f)

Análise Elementar: 1.48 %N, 3.95 %C, 1.39 %H e 5.05 %Eu

Procedeu-se da mesma forma, mas com as NPSg como base, obtendo o material NPSgC1 que contém as mesmas bandas de IV ($\eta=91.3\%$, $m_{\text{obt}}=0.354$ g).

2.4. Técnicas de caracterização

Para caracterizar os complexos e as nanopartículas derivatizadas sintetizadas foram utilizadas diversas técnicas: espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difracção de raios-X de pós (DRX), análise elementar, microscopia electrónica de varrimento (SEM) e microscopia electrónica de transmissão (TEM), bem como medidas de fluorescência e fluorescência em estado sólido.

2.4.1 Espectroscopia vibracional de Infravermelho com Transformada de Fourier (FTIR)

Foi utilizada a espectroscopia de infravermelho com o objectivo de se obter informação acerca das vibrações moleculares dos sistemas em estudo.

Os espectros de infravermelho foram adquiridos na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa, num espectrómetro *Thermo* (Nicolet 6700), entre 400-4000 cm^{-1} , com resolução 2 cm^{-1} . As amostras de complexos foram feitas em pastilhas de brometo de potássio (KBr), enquanto para as nanopartículas procedeu-se a DRIFT (reflectância difusa de infravermelho com transformada de Fourier) utilizando como matriz KBr.

2.4.2 Difracção de raios-X de pós (DRX)

A difracção de raios-X de pós foi utilizada para caracterizar as amostras na forma de pós soltos (nanopartículas). Em particular serviu para analisar a retenção da estrutura das nanopartículas mesmo com a adição dos complexos.

Os difractogramas de DRX foram efectuados na Faculdade de Ciências da Universidade de Lisboa num difractómetro Philips Analytical Pw 3050/60 X'Pert PRO (theta/2 theta) equipado com um detector X'Celerator e com aquisição automática de dados (X'Pert Data Collector (v2.0b) software), utilizando uma radiação monocromática $\text{CuK}\alpha$ com um feixe incidente de 40 kV-30 mA. Os difractogramas foram registados numa faixa de varrimento (2θ) entre 10° e 70° .

2.4.3 Análise Termogravimétrica (TGA)

Os estudos de TGA foram realizados com o propósito de caracterizar as nanopartículas, tanto de ferro como de sílica com e sem complexo. Esta técnica permite realizar para além das medidas clássicas de perdas de massa, verificar a reatividade da superfície com a atmosfera escolhida e verificar o ganho de massa quando a atmosfera é reactiva com as espécies químicas em estudo [81]. É possível identificar o tipo de ligação entre a nanopartícula e as moléculas em questão, portanto diferenciar entre moléculas adsorvidas física ou quimicamente de acordo com o pico de perda de massa, que depende da força de ligação.

O gráfico obtido permite identificar as diferentes etapas da decomposição da amostra, uma vez que cada perda de massa registada pode corresponder a um grupo constituinte da entidade molecular inicial que é eliminado. O uso desta metodologia neste trabalho, possibilita a demonstração da formação dos complexos.

Os estudos foram então realizados recorrendo a termobalança Thermogravimetric Analyzer 7, da *Perkin Elmer*, segundo um rampa de 10 $^\circ\text{C}/\text{min}$ desde a T_{amb} até 800 $^\circ\text{C}$ numa atmosfera de azoto e hélio (fluxo 100 mL/min).

2.4.4 Análise Elementar

A análise elementar é um procedimento utilizado para a determinação dos elementos constituintes de um determinado composto molecular, a nível qualitativo e quantitativo. A análise elementar consiste numa técnica analítica destrutiva [82].

2.4.5 Microscopia Electrónica de Varrimento (SEM) e Transmissão (TEM)

Foram efectuadas análises de SEM e TEM com o objectivo de se observar a morfologia e o tamanho das nanopartículas sintetizadas e as diferenças quando se introduziam alterações nas nanopartículas.

As análises de SEM e TEM foram realizadas no Laboratório de Microscopia Electrónica, Instituto Superior do Técnico, num microscópio FEG-SEM (*Field Emission Gun Scanning Electron Microscope*), da marca JEOL, modelo JSM-7001F. Foi utilizada uma tensão de aceleração que é visível nas imagens obtidas (kV) e as observações foram efectuadas utilizando electrões secundários que dão contraste à topografia.

As análises de TEM foram efectuadas num microscópio da Hitachi, modelo H-8100, com um filamento LaB₆ e foi utilizada uma tensão de aceleração de 200 kV. Como preparação de amostras, os pós foram colocados em suspensão em álcool etílico e, no caso das NP-Fe e NP-FeC₂ em Cr, posteriormente, foi colocada uma gota dessa suspensão sobre uma grelha de cobre com filme de Formvar e carbono. Deixou-se secar e em seguida observaram-se as amostras.

2.4.6 Espectroscopia de UV-Vis

De modo a determinar os picos máximos de absorvência do C2 ($1 \times 10^{-3} \text{M}$) procedeu-se ao estudo de espectroscopia por UV-Vis, no aparelho UV-Vis 2450 Shimadzu, à T_{amb} e utilizou-se como referência água Milli-Q.

2.4.7 Estudos de Fluorescência

Os espectros de fluorescência podem ser medidos nos modos de excitação ou emissão. No modo de excitação obtém-se um espectro do número de fótons emitidos (em unidades variáveis) em função do comprimento de onda da radiação incidente na amostra. A radiação incidente é monocromatizada na gama de comprimentos de onda desejada [83], geralmente a linha intra-4f⁶ mais intensa do európio (III). O espectro de excitação é normalmente constituído por bandas largas, correspondentes aos estados dos ligandos e linhas mais estreitas, correspondentes às transições intra-4f⁶. A análise

dos espectros de excitação permite que se obtenham informações sobre o processo de sensibilização do európio (III) dado que a intensidade relativa entre as componentes de excitação associadas aos estados excitados dos ligandos e aos níveis intra-4f⁶ indica qual o processo de excitação dominante: 1. sensibilização, se ocorre via os estados excitados dos ligandos, ou 2. excitação directa, se ocorre via os níveis intra-4f⁶.

O espectro de emissão mostra o número de fótons emitidos (em unidades variáveis) em função dos comprimentos de onda de excitação. A excitação pode ocorrer via os estados excitados dos ligandos, ou por excitação directa dos níveis intra-4f⁶, sendo normalmente constituído por linhas intra-4f⁶.

Partindo dos resultados obtidos em espectroscopia de UV-Vis e com os picos de absorvência máxima realizaram-se estudos de fluorescência no leitor de microplacas de 96 poços de modo a obter as intensidades de fluorescência das nanopartículas com o complexo C2 fluorescente (6.7 µM), funcionando o complexo C2 como branco para as nanopartículas de ferro e de sílica funcionalizadas (2 µg.mL⁻¹).

Os estudos de fluorescência foram realizados no leitor de microplacas de 96 poços Spectra MAX Gemini EM, *Molecular Devices*, a uma temperatura de 37 °C, utilizando como branco o complexo C2, tendo-se excitado aos comprimentos de onda de 264 e 288 nm.

Fluorescência em estado sólido

Este estudo de fluorescência em estado sólido foi realizado na Universidade de Aveiro e os espectros de fluorescência (nos modos de emissão e excitação) foram medidos à temperatura ambiente num espectrofluorímetro Fluorolog-3 Model FL3-2T com dupla excitação, e num espectrómetro de emissão simples TRIAX 320 acoplado a um fotomultímetro R928P, tendo-se usado o modo de aquisição frontal. A fonte de excitação usada foi uma lâmpada de Xénon a 450 W. A emissão foi corrigida para a resposta espectral dos monocromadores e do detector, usando o espectro de correcção típico fornecido pelo fabricante. Os espectros de excitação foram corrigidos para a distribuição espectral da intensidade da lâmpada usando um fotodíodo como detector de referência.

2.5 Cultura de células e testes citotóxicos *in vitro*

Foram usadas duas linhas celulares para estudar a actividade citotóxica dos complexos de európio sintetizados e das nanopartículas, assim como o seu mecanismo de acção. As linhas celulares humanas que foram utilizadas foram HeLa (adenocarcinoma cervical) e A549 (adenocarcinoma alveolar). A linha celular HeLa foi mantida em meio de cultura RPMI 1640 (Roswell Park Memorial Institute, sem L-glutamina), a linha A549 cresceu em meio de cultura DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium, sem L-glutamina). Ambos os meios foram suplementados com 10%

de soro bovino fetal (SBF), 1% de penicilina e estreptomicina (200 U/mL PEN-STREP) e 1% de L-glutamina (2 mM). Estes meios contêm um indicador de pH (vermelho de fenol) que muda a cor de amarelo para fúchsia consoante o pH seja ácido ou alcalino, respectivamente. Quando o meio se torna amarelo, este indica que as células consumiram a maior parte dos nutrientes e o meio não está suficientemente oxigenado, então é necessário trocar o meio de cultura para prevenir a morte celular. O SBF aumenta a fixação das células e providencia nutrientes adicionais e factores de crescimento que promovem um crescimento celular saudável e contém inibidores da tripsina.

As linhas celulares foram mantidas numa incubadora a 37 °C, numa atmosfera altamente humidificada com 95% ar da atmosfera/5% CO₂. Todos os procedimentos em que foi necessário manusear as células foram feitos numa câmara de fluxo laminar, com condições esterilizadas, assim como todo o material usado na cultura de células.

2.5.1 Criopreservação e ressuscitação de células congeladas

As células podem ser preservadas durante muito tempo se congeladas em azoto líquido, dando-se o nome de criopreservação. As células foram colhidas, centrifugadas a 900 rpm por 10 minutos e o *pellet* foi ressuscitado numa solução de 90% SBF/10% DMSO e foi colocado num frasco de criopreservação. O DMSO (dimetil sulfóxido) é um agente de criopreservação usado para baixar o ponto de congelação das alíquotas e prevenir a formação de cristais de gelo dentro das células no estado de congelação que pode levar a uma inviabilidade celular. Além disso, os frascos foram mantidos num recipiente de congelamento criogénico (“*Mr Frosty*”, preenchido com isopropanol) que permitiu que a temperatura dos mesmos baixe desde a T_{amb} até -80 °C a uma taxa de 1 °C por minuto. Depois disso os frascos criogénicos foram colocados num reservatório de azoto líquido para posteriormente poderem ser usados.

Quando as células preservadas são necessárias, elas são ressuscitadas removendo o frasco criogénico do azoto líquido e aquecido até 37 °C durante 1-2 minutos ou até os cristais derreterem. A suspensão celular é então transferida para um frasco de cultura contendo meio de crescimento pré-aquecido e em seguida são colocadas a 37 °C, na incubadora humidificada a 95% ar da atmosfera/5% CO₂.

2.5.2 Subcultura celular e quantificação

As células aderentes crescem numa camada contínua que eventualmente ocupa toda a superfície do frasco de cultura (estado confluyente). Quando isto acontece, as células param de se dividir, o crescimento para (senescência) e estas morrem. De modo a prevenir que o mesmo aconteça é necessário fazer subculturas de células. Neste

processo é necessário recolher as células, diluí-las em meio de crescimento e colocá-las num novo frasco de cultura promovendo o seu crescimento e viabilidade.

Quando as células crescem entre os espaços vazios do frasco e chegam à confluência (80%-90%), é necessário adicionar tripsina, enzima proteolítica, que é usado para desagarrar as células umas das outras e do frasco (tripsinização). Para isto, o meio de cultura consumido é retirado do frasco, as células são lavadas com tampão de fosfatos salino (PBS 1x, pH 7.4), retira-se e é adicionado tripsina ao frasco que é incubado a 37 °C durante 5 minutos. Depois da tripsinização, é adicionado PBS às células suspensas e uma fracção desta solução é adicionada a um novo frasco com meio de cultura suplementado.

De modo a obter resultados experimentais reprodutíveis e um óptimo crescimento celular é importante ter a densidade de crescimento apropriada. O método de quantificação celular mais comum envolve o uso de um hemocítmetro, uma lâmina de vidro espessa com uma grelha que contém 9 quadrados grandes e no seu interior tem 16 quadrados pequenos visíveis num microscópio óptico. Cada quadrado maior tem 1 mm x 1 mm e tem de profundidade 0.1 mm e, com a lamela no lugar, tem um volume de 0.1 mm³ (10⁻⁴ cm³). É assim possível calcular o número total de células numa solução por centímetro cúbico (ou mL) contando as células em cada quadrado maior multiplicando pelo factor de conversão correspondente ao volume do quadrado maior (10⁴).

2.5.3 Teste da actividade citotóxica *in vitro* utilizando um método colorimétrico

De modo a determinar a viabilidade celular depois de estarem expostas aos complexos e nanopartículas foi utilizado um teste colorimétrico, MTT (brometo de 3-(4,5-dimetiltiazol-2-il)-2,5-difeniltetrazolio). O MTT é um composto amarelo que pode ser reduzido pelo mitocondrial reductase a cristais de formazano roxos nas células viáveis [84]. Depois da quantificação celular, foram adicionadas 3 x 10⁵ células à microplaca de 96 poços e incubadas durante aproximadamente 48 h a 37 °C, na incubadora humidificada a 95% ar da atmosfera/5% CO₂, onde o crescimento celular obtido será o dobro do inicial. Posteriormente, o meio consumido foi removido e os compostos, em 8 concentrações diferentes (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 µg.mL⁻¹ ou 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 e 500 µg.mL⁻¹) dissolvidos em água esterilizada e meio suplementado, foram colocados em contacto com as células e incubados durante 48h. Foram adicionados à microplaca poços controlo com meio suplementado, tal como está esquematizado na Figura 1, de modo a ter um branco.

Depois das 48 h de incubação, o meio com o composto foi removido e foram adicionados a cada poço 100 µL da solução de MTT (0.5 mg/mL MTT dissolvido em meio) e incubado durante 2 h. Posteriormente foram adicionados 100 µL de DMSO a cada poço de modo a dissolver os cristais de formazano (estes não são solúveis em

meio aquoso). A absorvência foi medida a 570 nm utilizando um leitor de microplacas de 96 de poços (**Figura 10**).

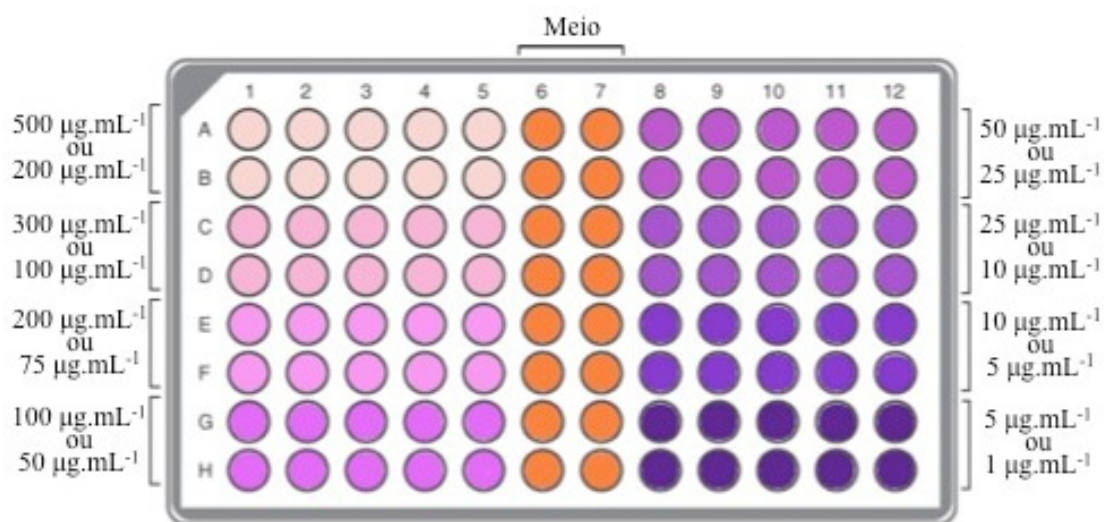


Figura 10. Esquema representativo com a distribuição das 8 concentrações de compostos dissolvidos em água esterilizada e meio suplementado (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ ou 5, 10, 25, 50, 100, 200, 300 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) e os poços controle contém somente meio suplementado (representados a laranja), numa microplaca de 96 poços, de acordo com o gradiente de cores depois de adicionar a solução de MTT.

Existe uma correlação directa entre a absorvência e a viabilidade celular. É assumido que a absorvência dos poços de controle (meio suplementado) corresponde a 100% da viabilidade celular, ou seja, todas as células desses poços estão metabolicamente activas. A viabilidade celular para cada concentração de cada composto é calculada com base no rácio entre a média das absorvências para cada concentração e a média das absorvências nos poços de controle.

De modo a determinar a influência do complexo e dos materiais e qual a viabilidade celular em contacto com as mesmas, foram feitos testes citotóxicos *in vitro* em células HeLa e A549 utilizando o teste do MTT.

2.5.4 Estudos de fluorescência nas células

Para os estudos de espectroscopia de fluorescência em meio celular, as células foram tratadas e incubadas numa microplaca preta de 96 poços tal como foi descrito anteriormente, tendo-se utilizado apenas uma das linhas celulares (HeLa). Aplicaram-se os compostos com uma concentração final de 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e incubaram-se as microplacas durante 2 h a 37 °C numa atmosfera humidificada de 5% CO_2 /95% ar atmosférico. Após o tempo de incubação, os compostos foram retirados e as células foram lavadas duas vezes com PBS (1x, pH 7.4). Os ensaios de espectroscopia de fluorescência foram realizados no leitor de microplacas de fluorescência, utilizando

como branco os poços apenas com meio suplementado, e tendo-se excitado aos comprimentos de onda de 264 e 288 nm. Os materiais utilizados foram dissolvidos em água Milli-Q estéril.

CAPÍTULO 3

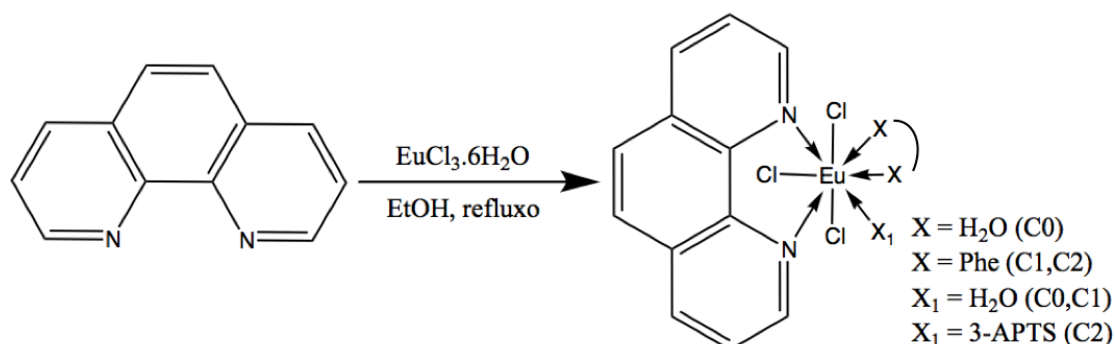
Resultados e Discussão

Resultados e Discussão

No presente trabalho procedeu-se à preparação de novos materiais que se propõem a ser utilizados como biosondas. Preparou-se assim dois tipos diferentes de nanopartículas: Nanopartículas de Ferro (NP-Fe) e Nanopartículas de Sílica (NPS) que posteriormente foram funcionalizadas com complexos de Európio (Eu) e fenantrolina (Phe). Depois de caracterizar e realizar diferentes tipos de estudos necessários, os materiais sintetizados foram expostos a testes de viabilidade celular em dois tipos de linhas celulares, do adenocarcinoma cervical humano (HeLa) e do adenocarcinoma alveolar humano (A549).

3.1 Síntese e caracterização dos Complexos

O estudo inicial deste trabalho partiu da síntese de complexos de európio e fenantrolina (Phe) (**C0-C2**) para criar as novas biosondas fluorescentes. Estes complexos foram sintetizados através da reacção da fenantrolina com o lantanídeo escolhido, európio (Eu), em etanol (EtOH) (**Esquema 1**), a refluxo durante 2 h.



Esquema 1. Síntese dos complexos de Fenantrolina e Európio (**C0-C2**).

Através da análise dos espectros de espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) pode-se comprovar que todos os complexos sintetizados eram os esperados.

O espectro de infravermelho dos complexos sintetizados (**C0-C2**) mostra as bandas típicas de ligações N-H, C=N e C=C, entre 3500 a 3300 cm⁻¹ (ν_{N-H}), 1680-1610 cm⁻¹ (ν_{C=N}) e 1600-1500 cm⁻¹ (ν_{C=C} aromático), assim como as bandas características do Európio a 1636, 1464 e 696 cm⁻¹. Através da comparação dos espectros (**Figura 11**) dos complexos percebe-se que todos têm a estrutura desejada, sendo também possível observar a banda correspondente à ligação do 3-APTS a 1085 cm⁻¹ (ν_{Si-O}) no complexo C2.

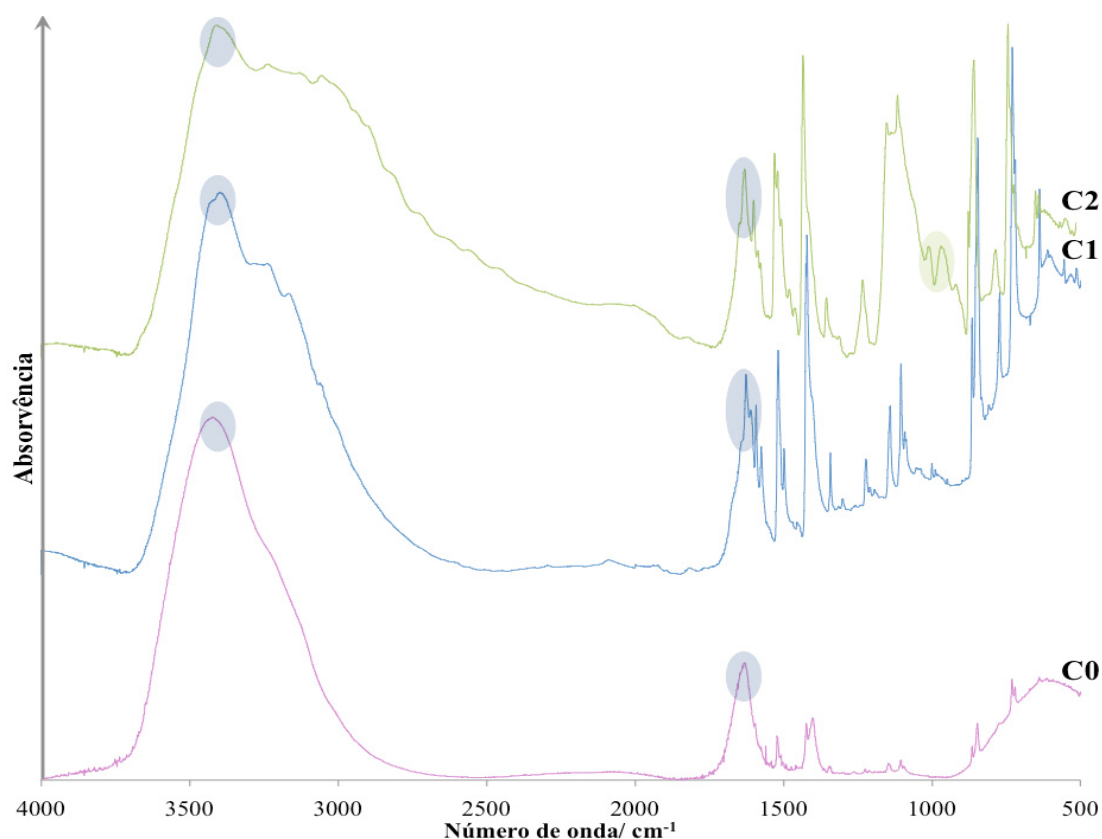


Figura 11. Espectros de infravermelho dos complexos C0-C2. As bandas a cinzento correspondem às bandas em comum entre os 3 complexos e a banda a verde corresponde à banda de sílica do 3-APTS.

Em seguida procedeu-se à análise por ultravioleta visível (UV-Vis) à T_{amb} tendo colocado na célula referência água Milli-Q a mesma na qual se dissolveu o complexo C2. Esta foi realizada de modo a poder determinar os picos máximos de intensidade de absorvência do complexo fluorescente C2, **Figura 12.a.**. Só se realizou para o complexo C2 pois foi o complexo usado nos estudos posteriores. Procedeu-se também à análise de fluorescência do complexo C2 com a concentração de $6.7 \mu\text{M}$, à temperatura de 37°C sendo este utilizado posteriormente como branco para os restantes estudos de fluorescência (**Figura 12.b.**). O branco utilizado neste ensaio de fluorescência foi água Milli-Q, solvente utilizado para dissolver o complexo C2.

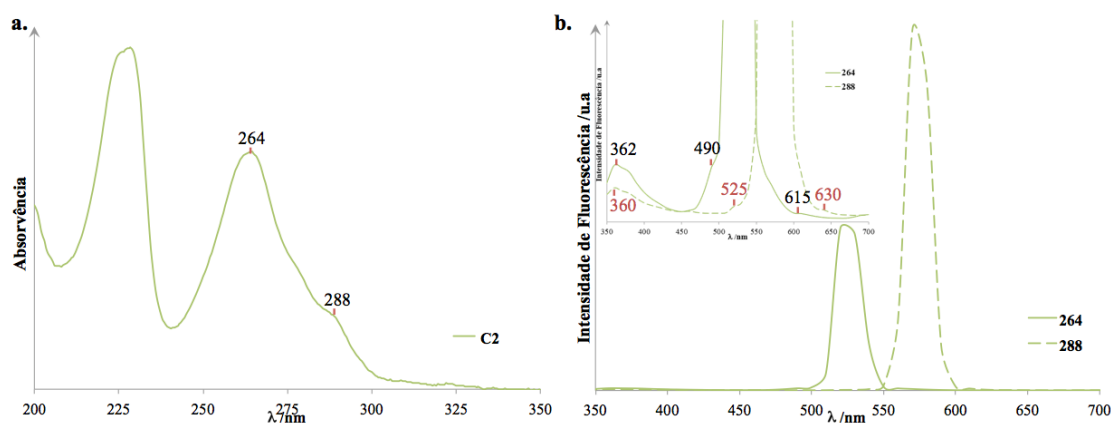


Figura 12. (a.) Espectro de UV-Vis do complexo C2; (b.) Espectro de fluorescência do complexo C2 aos dois comprimentos de onda máximos no UV-Vis, 264 e 288 nm, com uma ampliação dos picos. A preto encontram-se os λ_{em} do espectro a 264 nm e a vermelho do espectro a 288 nm.

Pela análise do espectro de UV-Vis obtemos dois picos de absorvência aos comprimentos de onda de 264 e 288 nm, correspondentes a todo o complexo e não só ao európio, sendo estes assim escolhidos como comprimentos de onda de excitação no estudo de fluorescência do complexo C2, por serem os picos de mais baixa energia, excitando assim a antena (fenantrolina). Pela observação do espectro de fluorescência do complexo C2 percebemos que este tem uma maior intensidade de fluorescência quando $\lambda_{exc} = 288\text{nm}$, mas o espectro que mais se assemelha e que tem o pico correspondente ao Eu é quando $\lambda_{exc} = 264\text{ nm}$, pois tem um $\lambda_{em} = 615\text{ nm}$ semelhante ao estabelecido pela literatura de 611 a 618 nm [37]. Foi necessário realizar uma ampliação na escala de intensidade de fluorescência, pois o pico que apresenta maior intensidade corresponde a um sinal originado pela difusão de 2.^a ordem do aparelho, que duplica o comprimento de onda ao qual a amostra é excitada, aparecendo dois picos a $\lambda_{em} \approx 528$ e 576 nm , respectivamente. Em ambos os espectros o pico a 362 e 360 nm correspondem ao 3-APTS, mesmo excitando a comprimentos de onda diferentes este pico mantém-se, e os picos a 490 e 525 nm são característicos do complexo C2, devido à antena fenantrolina.

Posteriormente realizaram-se os estudos de fluorescência em estado sólido em que se excitou o metal (Európio), a 612 nm, e obteve-se o resultado representado na **Figura S1** (ver em anexo); através do pico máximo do espectro a 355 nm, excitou-se novamente a este comprimento de onda e obteve-se o espectro de emissão representado na **Figura 13**, correspondente ao espectro de emissão do complexo C2.

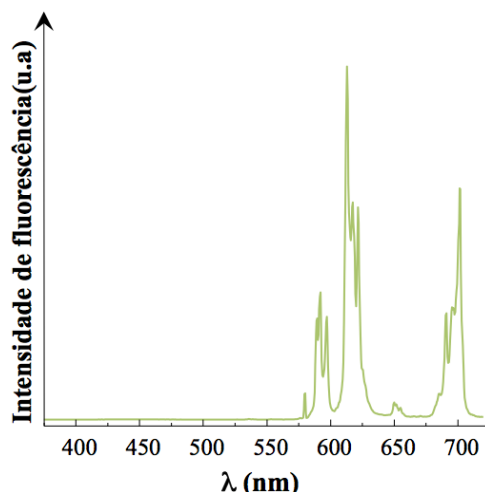


Figura 13. Caracterização do complexo de fenantrolina+európio+3-APTS (C2) por fluorescência de estado sólido, à T_{amb} , com excitação a 355 nm.

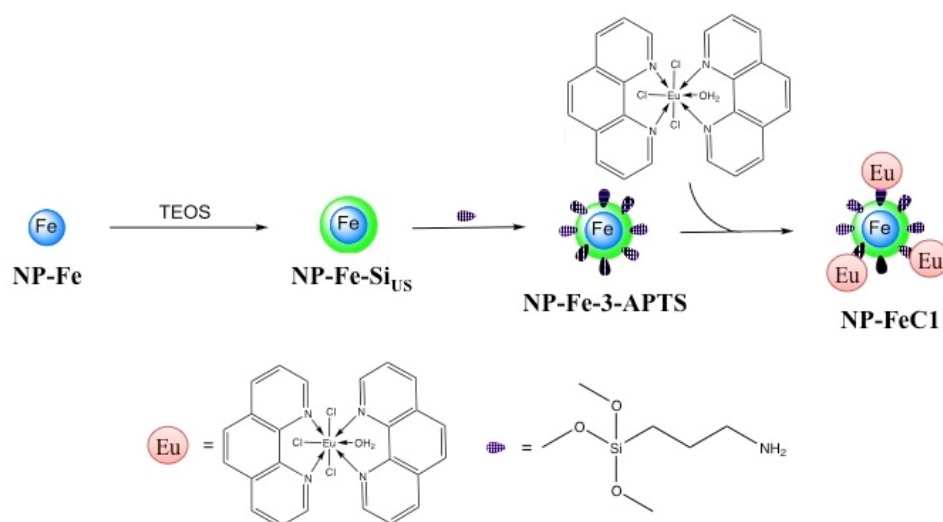
Este espectro é composto unicamente por linhas estreitas atribuídas às transições entre o primeiro estado excitado e o estado fundamental, relativamente às orbitais f do Eu. O facto de não se detectar a emissão dos níveis do ligando nos espectros de emissão e de serem detectados nos espectros de excitação sugere que os processos de transferência de energia do ligando \rightarrow metal nos complexos são eficientes.

3.2 Síntese e caracterização das Nanopartículas

Depois da síntese dos complexos passou-se à síntese do material de suporte, as nanopartículas.

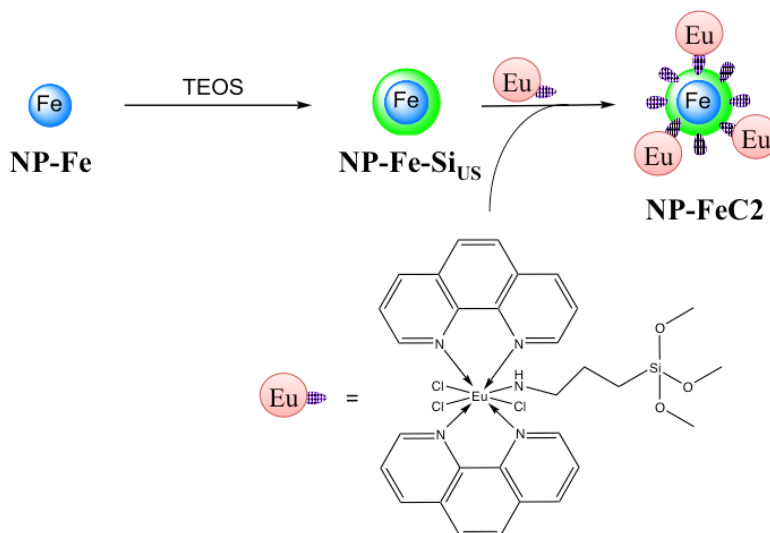
3.2.1 Nanopartículas de Ferro

As nanopartículas magnéticas de ferro (NP-Fe) foram sintetizadas através de um método de co-precipitação utilizando cloreto de ferro (II) e cloreto de ferro (III) com adição de amónia [79]. Em seguida, foram revestidas por uma camada de sílica utilizando tetraetilortossilicato (TEOS) como fonte de sílica [80] e amónia como agente para promover a hidrólise, as quais se designaram por NP-Fe-Si_{US}. A camada de sílica apresenta grupos Si-OH na sua superfície sendo possível condensar na superfície moléculas com átomos dadores, como por exemplo, azoto, que funcionam como ligandos. Desta forma, foi possível introduzir na camada de sílica o ligando 3-aminipropiltrimetoxissilano (3-APTS). Posteriormente, o complexo de európio (C1, $\text{EuCl}_3(\text{Phe})(\text{H}_2\text{O})_6$) foi coordenado ao ligando, **esquema 2**.



Esquema 2. Síntese das nanopartículas de ferro (NP-Fe) e funcionalização com o complexo C1 (EuCl₃.6H₂O e fenantrolina), utilizando separadamente o ligando 3-APTS (Síntese 1), adaptado de [85].

Depois de se obterem as nanopartículas procedeu-se à observação das mesmas sob uma luz ultravioleta (365 nm) e observou-se que estas não apresentavam fluorescência. Testou-se então um outro procedimento para a funcionalização das NP-Fe. O procedimento de revestimento foi igual, simplesmente sintetizou-se primeiro o complexo de európio e fenantrolina já com o ligando 3-APTS, ou seja o complexo C2, e só depois foi adicionado à superfície das NP-Fe, tal como está esquematizado no **Esquema 3**.



Esquema 3. Síntese das Nanopartículas de Ferro (NP-Fe) e funcionalização com o complexo C2 (3-APTS, EuCl₃.6H₂O e fenantrolina) (Síntese 2), adaptado de [85].

Nesta nova síntese as NP-Fe funcionalizadas com o complexo C2 foram submetidas ao mesmo teste com uma lâmpada ultra-violeta a 365 nm e emitiram fluorescência

comprovando que as NP-Fe não fazem extinção da fluorescência como se pode observar na **Figura 14**.

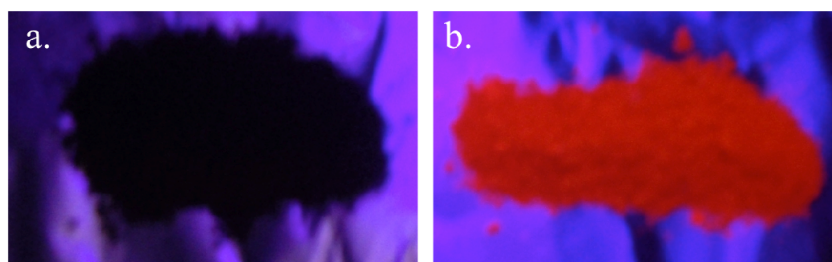


Figura 14. Fotografia das NP-Fe (**a.**) e das NP-Fe funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2, **b.**) sob uma luz ultravioleta a 365 nm.

Depois da sua síntese procedeu-se então à caracterização das NP-FeC2, deixando de parte as NP-FeC1 uma vez que não apresentaram fluorescência, pressuposto do trabalho. As NP-FeC2 foram então caracterizadas por infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difracção de raios-X de pós (DRX), termogravimetria (TGA), microscopia electrónica de transmissão (TEM) e de varrimento (SEM). Primeiramente procedeu-se ao FTIR (**Figura 15**) de modo a perceber se a reacção tinha ocorrido, pela análise dos modos de vibração dos diferentes grupos funcionais.

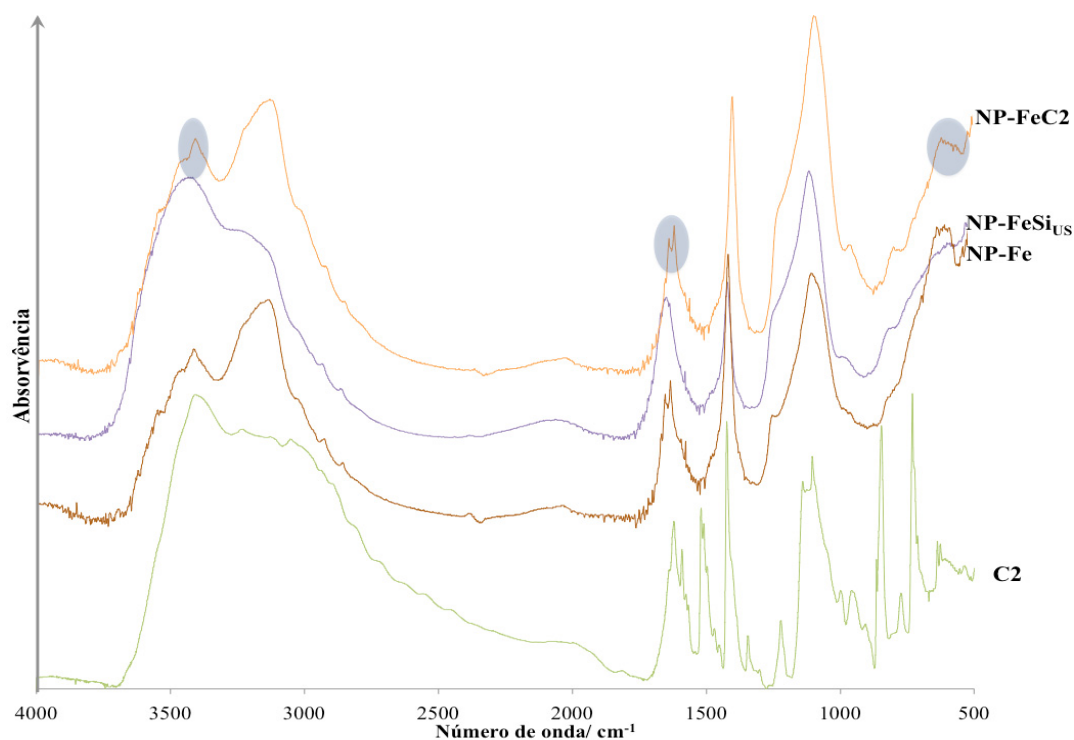


Figura 15. Espectros de infravermelho das NP-Fe e NP-Fe funcionalizadas com o complexo C2.

Através da comparação dos espectros das nanopartículas de ferro (NP-Fe) e das mesmas revestidas com sílica (NP-Fe-Si_{US}) observamos que ambas contêm uma banda atribuída ao modo $\nu_{\text{Fe-O}}$ (755 cm^{-1}) e as NP-Fe-Si_{US} apresentam uma banda atribuída ao modo $\nu_{\text{Si-O}}$ (1060 cm^{-1}) devido ao seu revestimento com sílica. Após reagir com o complexo C2 sintetizado anteriormente foi possível observar a presença de bandas características do mesmo, correspondentes aos grupos funcionais do complexo C2, como é o caso do grupo funcional das aminas, modo $\nu_{\text{N-H}}$ ($3500\text{--}3300\text{ cm}^{-1}$), da amina no anel aromático, modo $\nu_{\text{C=N}}$ ($1680\text{--}1610\text{ cm}^{-1}$) e dos carbonos aromáticos, modo $\nu_{\text{C=C aromático}}$ ($1600\text{--}1500\text{ cm}^{-1}$). Todos estes modos são possíveis de serem observados no espectro de FTIR do complexo C2.

As nanopartículas sintetizadas foram, ainda, caracterizadas por difracção de raios-X de pós (DRX). Os difractogramas de raios-X das NP-Fe tanto funcionalizadas com o complexo C2, como sem serem funcionalizadas, mostram que estão presentes cinco reflexões cuja indexação se encontra na **Figura 16**, que nos permite concluir que as nanopartículas de ferro sintetizadas são magnetite (Fe₃O₄).

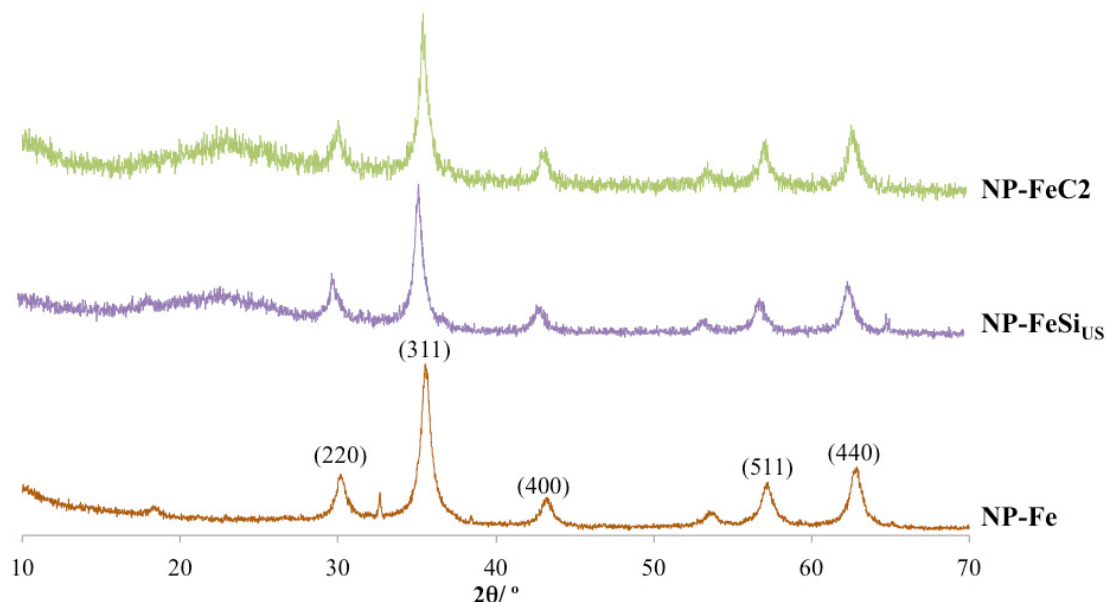


Figura 16. Difractogramas de raios-X de pós das NP-Fe, NP-Fe-Si_{US} e NP-FeC2.

Ao analisar os difractogramas verifica-se que a adição de sílica às nanopartículas e a reacção com o complexo C2 deu origem a pequenos desvios nos valores de 2θ , pelo facto de se terem funcionalizado as nanopartículas com espécies orgânicas e metálicas preservando, no entanto, a sua estrutura, confirmada por DRX de pós.

Seguidamente procedeu-se a uma análise de termogravimetria (TGA) de modo a determinar a perda de massa e calcular a quantidade de complexo C2 que se ligou às NP-Fe-Si_{US}, obtendo-se o termograma apresentado na **Figura 17**.

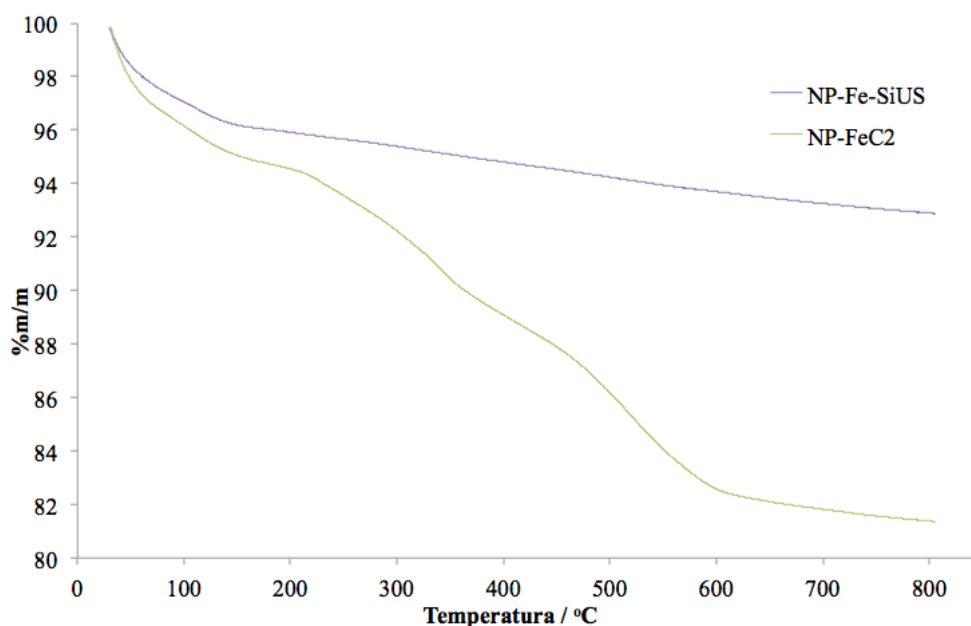


Figura 17. Perfil de termogravimetria das nanopartículas de ferro (NP-Fe-Si_{US}) e das mesmas funcionalizadas com o complexo C2.

Pela observação dos perfis termogravimétricos das NP-Fe-Si_{US} percebeu-se que houve uma perda de 3.5% de massa, na região dos 25 °C até aos 150 °C, muito pequena comparativamente ao perfil termogravimétrico das mesmas funcionalizadas com o complexo C2. Esta perda de massa é devida à presença de água adsorvida à superfície das nanopartículas. Nas NP-FeC2 são perceptíveis dois patamares, o primeiro na região dos 225 °C até aos 375 °C, que corresponde à perda de massa da água que faz parte do complexo C2 e a que se encontra adsorvida à superfície das nanopartículas, com uma perda de 5.4% e finalmente um segundo patamar na região dos 375 °C até aos 600 °C, correspondente ao complexo C2 com uma perda de aproximadamente 8%, obtendo-se assim a quantidade de complexo que foi libertada, cerca de 0.37 mg.

Com o objectivo de caracterizar morfologicamente as nanopartículas de ferro, recorreu-se a técnicas de microscopia, nomeadamente, microscopia electrónica de transmissão (TEM) e microscopia electrónica de varrimento (SEM). A imagem de SEM (**Figura 18.a.**) da amostra NP-Fe-Si_{US} revela que as nanopartículas apresentam uma morfologia esférica e esponjosa bem como um certo grau de agregação, confirmando que o revestimento das nanopartículas de ferro (NP-Fe) com sílica por meio de ultra sonicação foi realizado com sucesso, originando NP-Fe-Si_{US}. A imagem de TEM (**Figura 18.b.**) da amostra referida revela que as nanopartículas têm um diâmetro de, aproximadamente, 30 nm, e que se encontram revestidas por uma camada de sílica.

Após a funcionalização da superfície das nanopartículas com o complexo C2, obteve-se a amostra NP-FeC2 cuja imagem de SEM (**Figura 18.c.**) mostra que a forma das nanopartículas não sofreu qualquer alteração após a reacção na sua superfície. E,

ainda, a imagem de TEM (**Figura 18.d.**) revela que as nanopartículas se mantiveram com o mesmo nível de agregação.

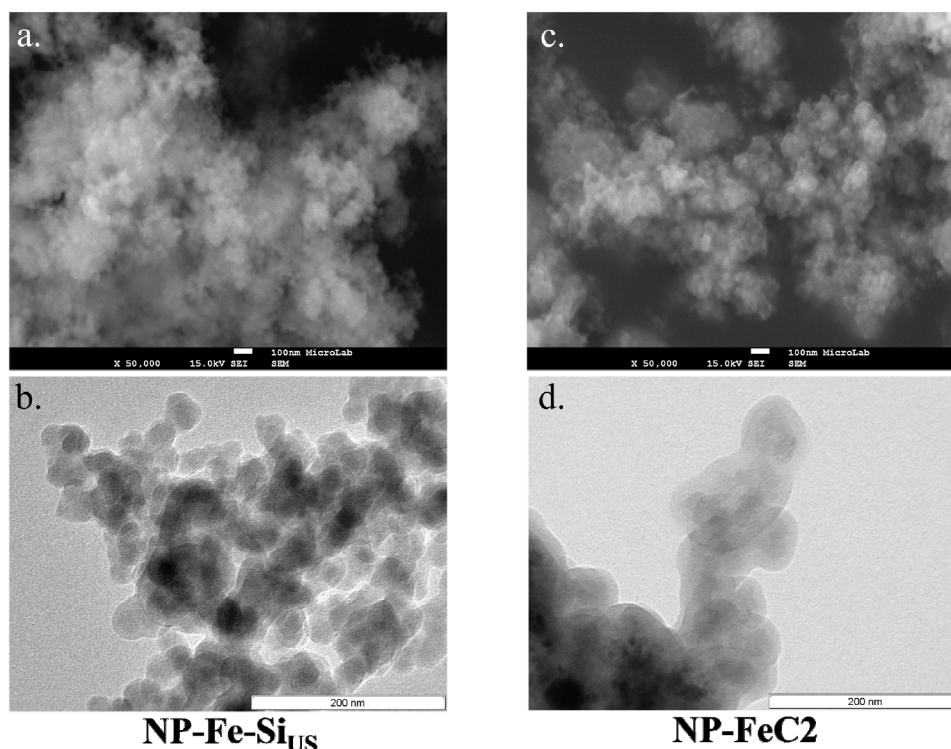


Figura 18. Imagens de SEM (a., c.) e TEM (b., d.) das amostras NP-Fe-Si_{US} e NP-FeC₂, respectivamente.

Conclui-se também que as NP-FeC₂ tinham um diâmetro de aproximadamente 30 nm, mesmo depois de funcionalizadas, pois o complexo em causa tem uma massa molecular relativamente leve ($MM(C2) \approx 797 \text{ g.mol}^{-1}$).

Por fim procedeu-se à determinação por análise elementar de modo a determinar a quantidade de Európio que efectivamente teria reagido com as nanopartículas de ferro (NP-Fe) obtendo 6.71% de Európio na amostra NP-FeC₂, valor este bastante razoável e suficiente para que as mesmas possam funcionar com o objectivo pretendido, como biosondas magneto-fluorescentes.

Depois de toda esta caracterização pode-se concluir que as nanopartículas de ferro (NP-Fe) foram funcionalizadas com o complexo com sucesso e apresentam resultados promissores.

3.2.2 Nanopartículas de Sílica

Em seguida procedeu-se à síntese de nanopartículas de sílica (NPS) que apesar de não apresentarem magnetismo serviram como material de comparação em relação às NP-Fe, estas nanopartículas de sílica foram sintetizadas através de um método de co-precipitação de tetraetilortossilicato (TEOS), amónia, água Milli-Q na presença de

metanol [12]. Depois de formadas estas já apresentam grupos Si-OH na sua superfície, contrariamente às NP-Fe que tinham de ser revestidas com uma camada, sendo possível condensar na sua superfície moléculas com átomos dadores, como por exemplo, azoto, fósforo, etc, que funcionam como ligandos. Procedeu-se seguindo o mesmo esquema de síntese das NP-Fe, introduzindo o ligando 3-aminopropiltrimetoxissilano (3-APTS) e posteriormente o complexo de Európio (C1, $\text{EuCl}_3(\text{Phe})(\text{H}_2\text{O})_6$) foi coordenado ao ligando obtendo o material NPSC1 (Nanopartículas de sílica funcionalizadas com o complexo C1). O processo foi semelhante ao realizado nas NP-Fe tendo igualmente duas sínteses, uma em que o ligando 3-APTS é colocado isoladamente (Síntese 1) com o C1 e a outra em que o ligando é colocado juntamente com o complexo de Európio (C2) obtendo o material NPSC2 (Nanopartículas de sílica funcionalizadas com o complexo C2).

Depois de obtidas as nanopartículas realizou-se o mesmo procedimento que para as NP-Fe colocando as mesmas sob uma lâmpada de luz ultravioleta de 365 nm, mas o resultado foi igual para ambas as sínteses, ou seja, tanto as NPSC1 como as NPSC2 fluoresceram como é demonstrado na **Figura 19**.

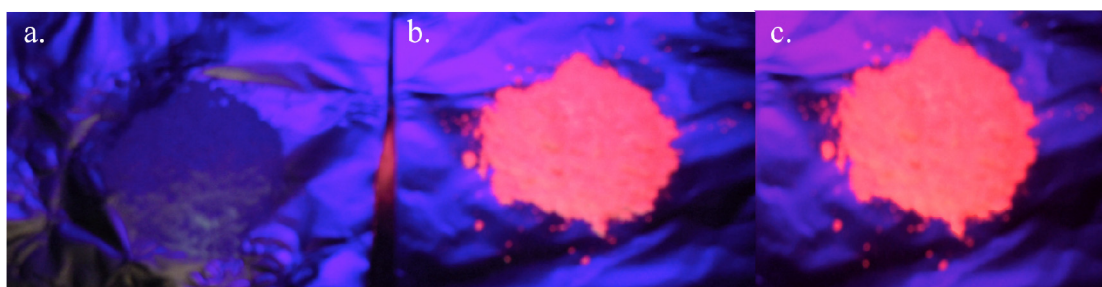


Figura 19. Fotografia das NPS (a.), das NPS funcionalizadas com o complexo C1 (NPSC1, b.) e NPS funcionalizadas com o complexo C2 (NPSC2, c.) sob uma luz ultravioleta a 365 nm.

Pelo método descrito anteriormente o rendimento da síntese das nanopartículas apresentou um valor não muito elevado, sendo então necessário adequar a síntese para a obtenção de um rendimento mais elevado. Ao fazer-se uma nova síntese em que se obtiveram nanopartículas de sílica com um maior diâmetro, denominadas como NPSg, estas apresentaram um maior diâmetro tendo sido determinado através da microscopia electrónica de transmissão (TEM) e de varrimento (SEM). Realizou-se um teste simples às amostras de NPS obtidas em que se conseguia perceber que as NPS de menor diâmetro quando agitadas demoravam mais tempo a depositar-se do que as de maior diâmetro.

Com o objectivo de caracterizar as NPS morfológicamente e perceber se realmente tinha-mos dois tamanhos diferentes de nanopartículas, recorreu-se às técnicas de microscopia electrónica de transmissão (TEM) e de varrimento (SEM), como se pode comprovar nas **Figuras 20**, para as NPS, e **21**, para as NPSg.

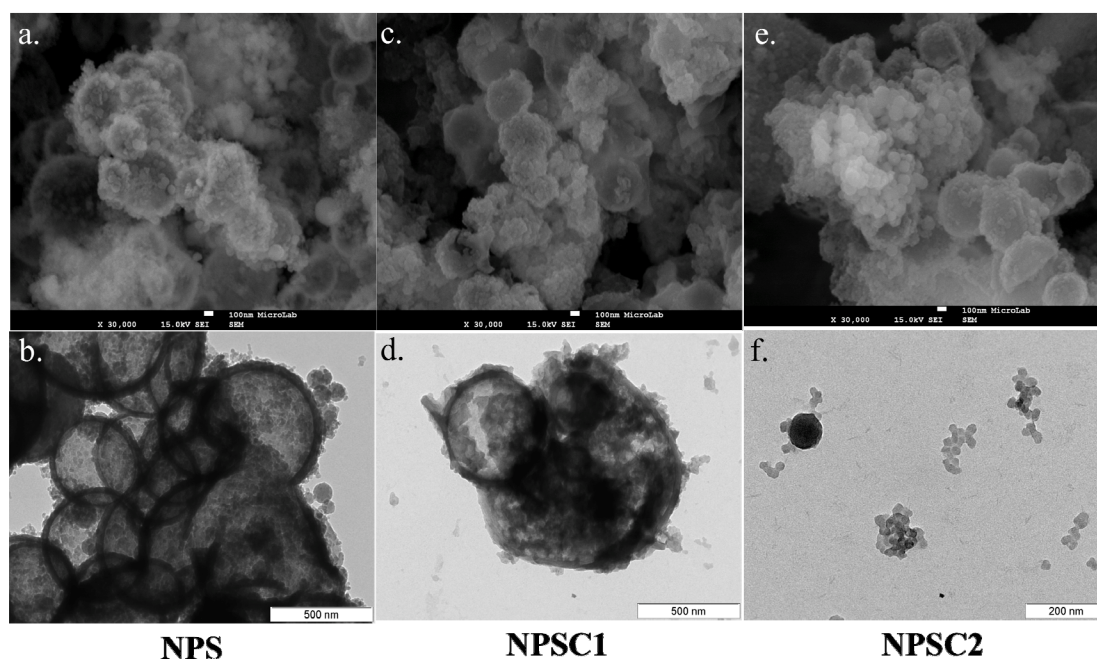


Figura 20. Imagens de SEM (a., c., e.) e TEM (b., d., f.) das amostras NPS, NPSC1 e NPSC2, respectivamente.

Pela observação das imagens de SEM (**Figura 20.a., c. e e.**) das NPS, NPSC1 e NPSC2, respectivamente, observa-se que estas apresentam uma morfologia esférica bem denotada e consegue-se perceber que temos NPS maiores com outras de tamanho menor à volta. As nanopartículas encontrando-se ou não funcionalizadas mantêm sempre a mesma estrutura, ao longo de toda a síntese.

As imagens de TEM (**Figura 20.b., d. e f.**) das amostras referidas revelaram que as nanopartículas apresentavam um diâmetro de, aproximadamente, 50 nm as mais pequenas e as maiores entre 200 e 500 nm. No caso das NPS funcionalizadas com os complexos de európio (C1 e C2) na sua superfície observou-se que estas não se encontram tão agregadas.

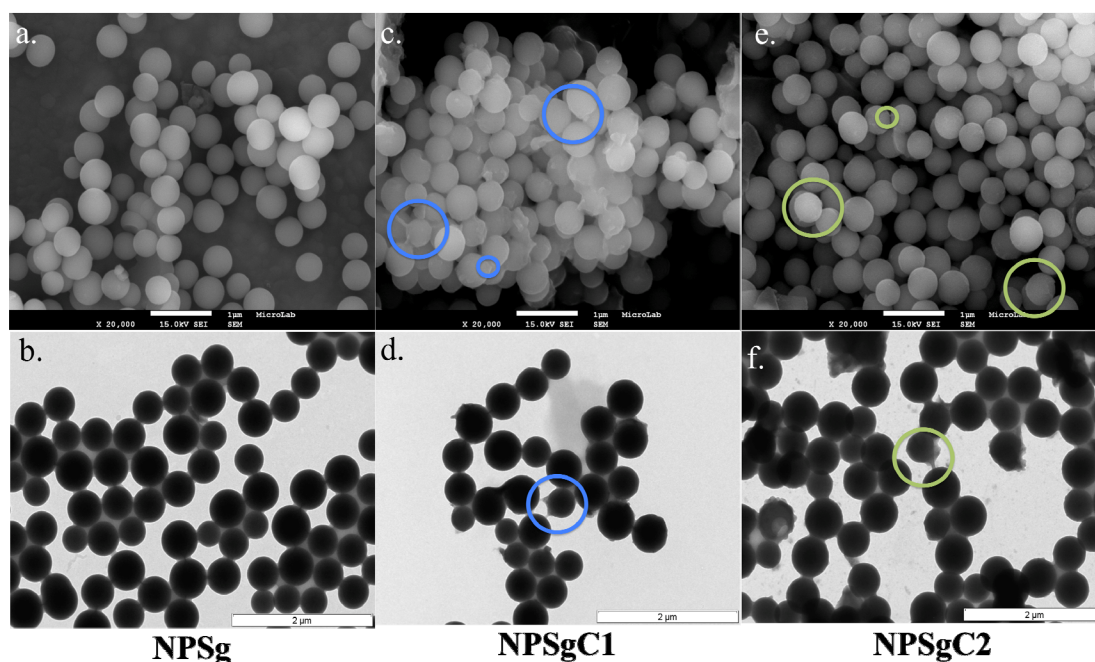


Figura 21. Imagens de SEM (a., c., e.) e TEM (b., d., f.) das amostras NPSg, NPSgC1 e NPSgC2, respectivamente. Os círculos a azul e verde representam os locais onde se consegue observar a possível ligação dos complexos às NPSg.

Pelas imagens de SEM das nanopartículas sintetizadas pela segunda via (**Figura 21.a., c. e e.**) podemos observar que estas também apresentavam uma forma esférica muito bem definida e uma agregação muito semelhante. Em comparação com as NPS mais pequenas, estas (NPSg) apresentam um tamanho de 500 nm, o mesmo que as de maior diâmetro das NPS. As nanopartículas NPSg apresentam uma diferença muito relevante em relação às NPS, são mais regulares e todas elas apresentam o mesmo tamanho, comprovando o resultado que se esperava que estas teriam um maior diâmetro, resultado revelado pelas imagens de TEM (**Figura 21.b., d. e f.**)).

Tal como foi descrito anteriormente para as NP-Fe, recorreu-se às mesmas técnicas de caracterização, espectroscopia de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR), difracção de raios-X de pós (DRX) e análise de termogravimetria (TGA). Depois de analisadas as nanopartículas de sílica (NPS) nos seus diferentes tamanhos recorreu-se à técnica de FTIR de modo a perceber se estas tinham sido funcionalizadas com sucesso com os complexos C1 e C2, como se pode observar pelos espectros de infravermelho da **Figura 22**.

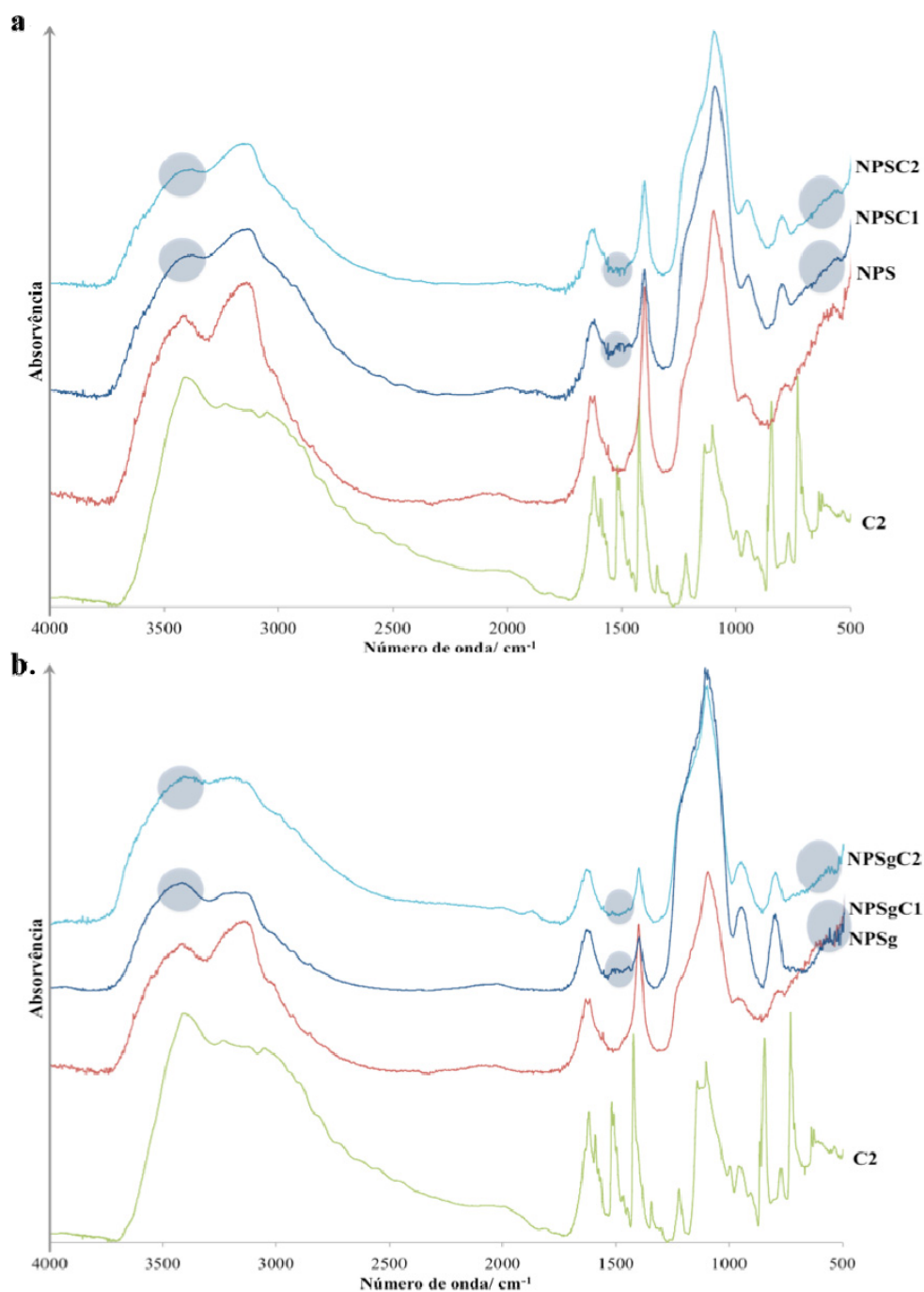


Figura 22. Espectros de infravermelho das NPS, NPS funcionalizadas com o complexo C1 (NPSC1) e com o complexo C2 (NPSC2) (**a.**), assim como os espectros das NPS de maior diâmetro (NPSg), NPSg funcionalizadas com os complexos C1 (NPSgC1) e C2 (NPSgC2) (**b.**).

Através da observação dos espectros anteriores podemos concluir que em qualquer um dos tipos de nanopartículas de sílica, tanto nas de diâmetro inferior (NPS) como nas de diâmetro superior (NPSg) as bandas características são iguais apresentando a banda característica do modo $\nu_{\text{Si-O}}$ (1060 cm^{-1}). Este modo também se encontra

presente quando as nanopartículas são funcionalizadas com qualquer um dos complexos C1 ou C2, mostrando que a estrutura não é alterada. Após reagir, tanto com o complexo C1, como com o C2, anteriormente sintetizados, foi possível observar a presença das bandas características dos mesmos, correspondentes aos seus grupos funcionais, tal como já tinha acontecido anteriormente nas NP-Fe. As bandas características e que nos permitiram concluir que a reacção tinha ocorrido como esperado são as do grupo funcional das aminas, modo $\nu_{\text{N-H}}$ ($3500\text{-}3300\text{ cm}^{-1}$), da amina no anel aromático, modo $\nu_{\text{C=N}}$ ($1680\text{-}1610\text{ cm}^{-1}$) e dos carbonos aromáticos, modo $\nu_{\text{C=C}}$ aromático ($1600\text{-}1500\text{ cm}^{-1}$).

A partir destes resultados podemos concluir que o tamanho das NPS não influencia o método de funcionalização das mesmas, pois estas apresentam espectros muito idênticos. O método de funcionalização das NPS também não influencia a fluorescência das NPS, contrariamente às NP-Fe, pois ambos os complexos reagiram e brilharam sob a lâmpada com luz ultravioleta.

As nanopartículas sintetizadas foram, ainda, caracterizadas por difracção de raios-X de pós (DRX). Os difractogramas de raios-X das NPS (**Figura 23**) tanto das de menor (a.) como de maior diâmetro (b.) apresentam estruturas semelhantes, mesmo quando são funcionalizadas com qualquer um dos complexos, como quando não estão funcionalizadas. Os difractogramas para ambos os tipos de nanopartículas apresentam uma reflexão, com uma forma de bossa a $2\theta = 22.5^\circ$, apresentando uma diminuição de intensidade à medida que as NPS e NPSg vão sendo funcionalizadas. Isto deve-se ao facto de a sílica ser um material amorfo e como tal o difractograma apresenta este aspecto pois a amostra a ser analisada não é um material cristalino.

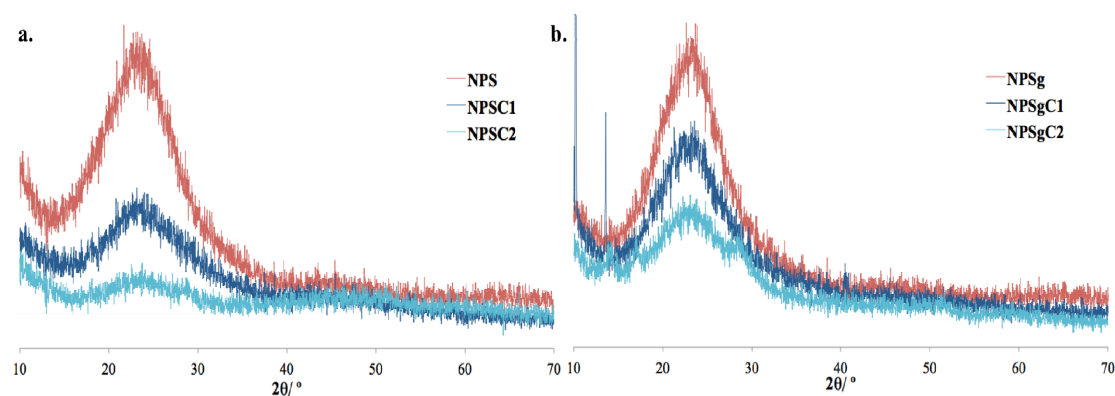


Figura 23. Difractogramas de raios-X de pós das NPS, NPSC1 e NPSC2 (a.) e das NPSg, NPSgC1 e NPSgC2 (b.).

Tendo estes pressupostos dos resultados obtidos anteriormente relativamente aos dois tipos de NPS, apenas prosseguimos os estudos de termogravimetria (TGA) e análise elementar com as NPS (as de menor diâmetro), apesar de apresentarem um rendimento mais baixo, pois ambas têm o mesmo comportamento, estrutura e caracterização. Uma vez que a nível celular só poderemos utilizar estas, devido a apresentarem um menor diâmetro para que se possa dar a passagem na barreira

hemato-encefálica. Procedeu-se então a uma análise de termogravimetria (TGA) de modo a determinar-se a perda de massa e a quantidade de complexo (C1 e C2) que se ligou às NPS ao longo do tempo com a subida de temperatura, obtendo-se os termogramas representados na **Figura 24**.

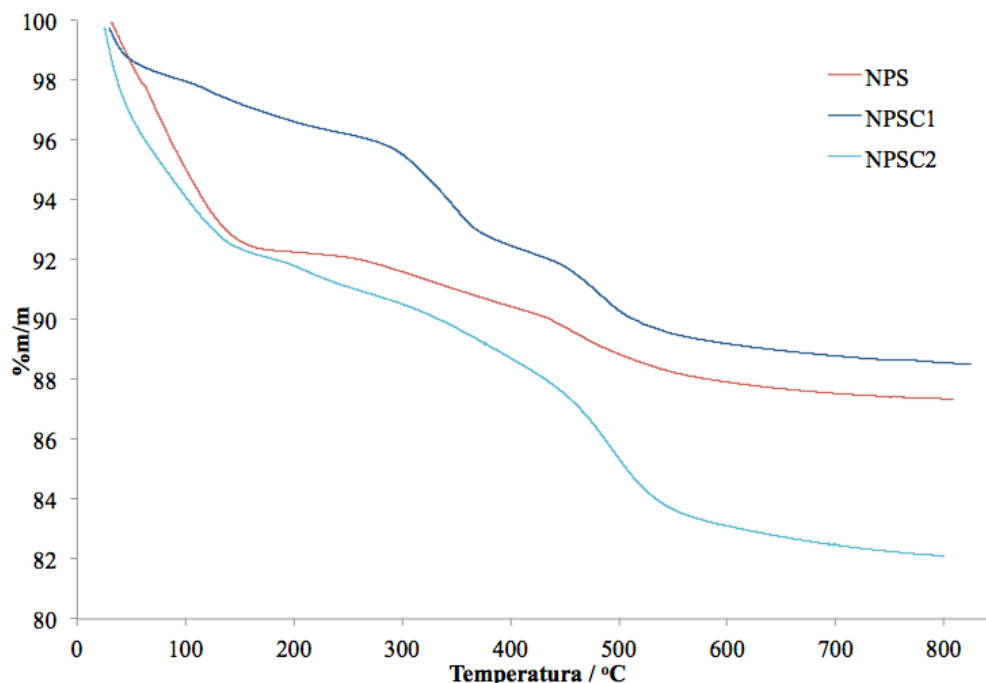


Figura 24. Perfil de termogravimetria das nanopartículas de sílica (NPS) e das mesmas funcionalizadas com os complexos C1 e C2.

Ao analisar-se o perfil termogravimétrico da amostra de NPS pode-se dizer que houve uma perda inicial de 8% na região dos 25 °C até aos 150 °C correspondendo ao solvente metanol utilizado na síntese e a moléculas de H₂O que se encontram adsorvidas à superfície das nanopartículas. Em seguida observa-se uma perda de 2.1% na gama dos 150 °C até aos 470 °C e por fim na gama dos 470 °C até aos 800 °C observa-se uma perda de massa à volta de 3.2%. As NPS funcionalizadas com os complexos C1 e C2 apresentam um perfil termogravimétrico semelhante às NP-FeC2 pois apresentam os mesmos dois patamares; um primeiro correspondente à perda de 3.8% e 1.6%, respectivamente para os complexos C1 e C2, esta perda situa-se na região dos 25 °C até aos 150 °C e corresponde à perda de massa da água que está adsorvida à superfície das nanopartículas, para ambas as amostras de nanopartículas, NPSC1 e NPSC2. Um segundo patamar correspondente ao complexo de európio, que para as NPSC1 apresenta uma perda de massa de 3.3% correspondente ao complexo C1 e a uma massa de 0.33 mg. Por outro lado para as NPSC2 obteve-se uma perda de massa de 7.6% correspondente ao complexo C2 e a uma massa de 0.45 mg. Estas perdas de massa situam-se entre os 150 °C e os 510 °C. Podemos assim concluir que o complexo C2 ligou-se em maior quantidade às NPS.

Em última análise procedeu-se a estudos de análise elementar de modo a perceber a quantidade de Európio que efectivamente teria reagido com as nanopartículas de sílica (NPS) obtendo 3.15% de Európio na amostra NPSC1 e 5.05% de Európio na amostra NPSC2. Estes valores são ligeiramente inferiores ao das NP-FeC2, mas são bastante razoáveis e suficientes para que as mesmas possam funcionar com o objectivo pretendido, como biosondas fluorescentes.

Depois de toda esta caracterização pode-se concluir que as nanopartículas de sílica (NPS) foram funcionalizadas com o complexo com sucesso e apresentam resultados promissores.

3.2.3 Estudos de Fluorescência

De acordo com o objectivo deste trabalho foi necessário recorrer a ensaios de fluorescência, de modo a perceber se os materiais sintetizados e funcionalizados podiam ser utilizados como biosondas fluorescentes.

Depois de analisado o espectro de UV-Vis e de fluorescência do complexo C2 (**Figura 12**) percebeu-se a quais os comprimentos de onda que se iriam excitar as amostras, comprimento máximo de absorção do complexo. Utilizou-se o complexo de európio e fenantrolina (C2) como branco para as amostras que foram analisadas (NP-FeC2, NPSC1 e NPSC2), retirando assim a fluorescência intrínseca do complexo e obteve-se a fluorescência somente do complexo ligado às nanopartículas e não do mesmo isolado. Foi assim utilizada uma concentração de $200 \mu\text{g}.\text{ml}^{-1}$ para qualquer uma das amostras, a 37°C , e estas foram excitadas a 264 e 288 nm, obtendo-se a representação gráfica que se encontra na **Figura 25**.

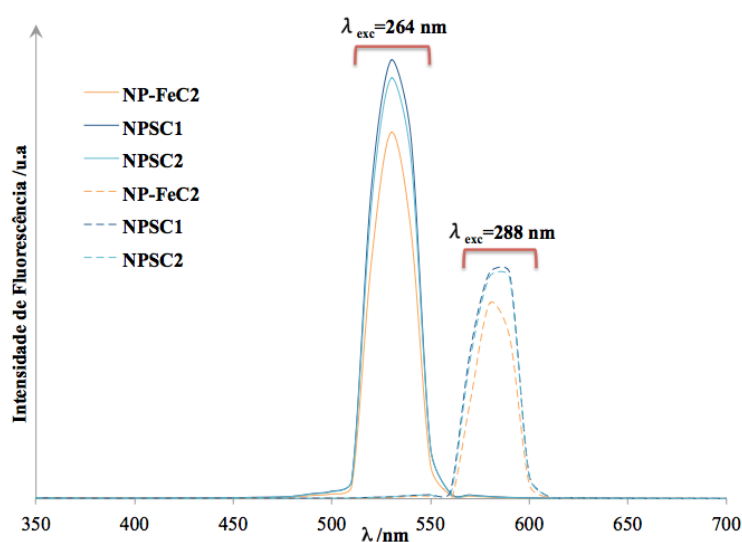


Figura 25. Espectro de fluorescência das nanopartículas de ferro funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2) e das nanopartículas de sílica funcionalizadas com os complexos C1 (NPSC1) e C2 (NPSC2). A linha a cheio corresponde à excitação a 264 nm e a tracejado a 288 nm.

Devido ao sinal originado pela difusão de 2.^a ordem do aparelho, observado na figura anterior, a $\lambda_{em} = 528$ nm e $\lambda_{em} = 576$ nm, foi necessário realizar uma ampliação na escala de intensidade de fluorescência de modo a conseguir-se detectar os picos característicos do ligando (3-aminopropiltrimetoxissilano) e dos complexos de európio e fenantrolina (C1 e C2), representados na **Figura 26**.

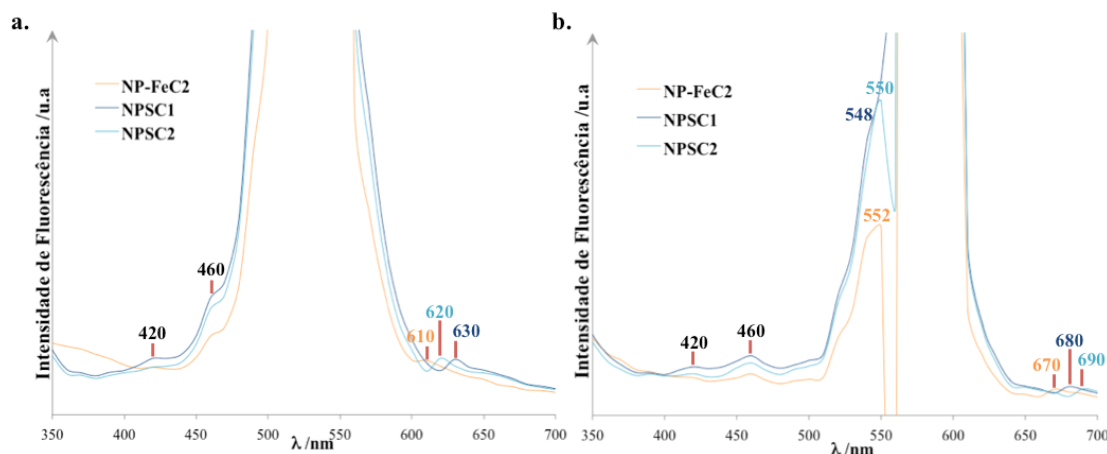


Figura 26. Representação gráfica da ampliação dos espectros de fluorescência correspondentes à excitação da amostra a 264 nm (a.) e 288 nm (b.) das nanopartículas de ferro funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2) e das nanopartículas de sílica funcionalizadas com os complexos C1 (NPSC1) e C2 (NPSC2).

A observação das representações gráficas anteriores permite-nos concluir que tal como anteriormente podemos observar os picos correspondentes ao ligando, 3-aminopropiltrimetoxissilano, a 420 nm e 460 nm, sendo estes diferentes dos obtido anteriormente (362 e 360 nm) devido à ligação às nanopartículas. Tal como já tinha acontecido no estudo de fluorescência do complexo C2, o pico característico do Eu, 611 a 618 nm segundo a literatura, encontra-se presente aquando da excitação a 264 nm como é perceptível na **Figura 26.a.** para ambas as nanopartículas, NP-Fe e NPS, obtendo comprimentos de onda de emissão muito próximos dos expectáveis, 610 a 630 nm. Na **Figura 26.b.** aparece um novo pico muito semelhante para qualquer uma das nanopartículas a $\lambda_{em} \approx 550$ nm, que corresponde a uma transferência de energia específica do complexo C2 e existe um desvio de 60 nm das bandas específicas do Eu.

Tal como já foi feito anteriormente para o complexo C2, realizaram-se estudos de fluorescência em estado sólido, em que se excitou o metal (Európio), a 612 nm, e obteve-se o resultado representado na **Figura S1** em anexo, e através do pico máximo do mesmo, 280 nm, obteve-se o espectro de emissão representado na **Figura 27**, correspondente ao espectro de emissão das nanopartículas de ferro funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2).

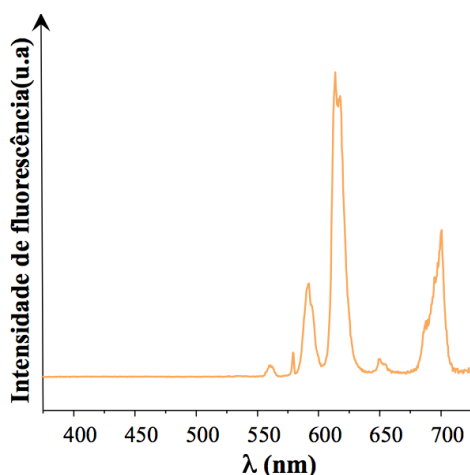


Figura 27. Caracterização das nanopartículas de ferro funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2) por fluorescência de estado sólido, à T_{amb} , com excitação a 280 nm.

O espectro de emissão é composto por linhas estreitas atribuídas às transições energéticas f-f. O espectro de excitação (ver **Figura S2** em anexo) é dominado por uma banda muito larga, na gama 260-350 nm atribuída aos estados excitados do ligando.

Procedeu-se da mesma forma para as nanopartículas de sílica funcionalizadas com os complexos C1 e C2 (NPSC1 e NPSC2) em que se excitou o metal (Európio), a 619 e 614 nm, respectivamente, e obteve-se o resultado representado na **Figura S3**, em anexo, e através dos pico máximos dos mesmos a 342 e 290 nm, respectivamente, obteve-se o espectro de emissão representado na **Figura 28**, das NPSC1 e NPSC2.

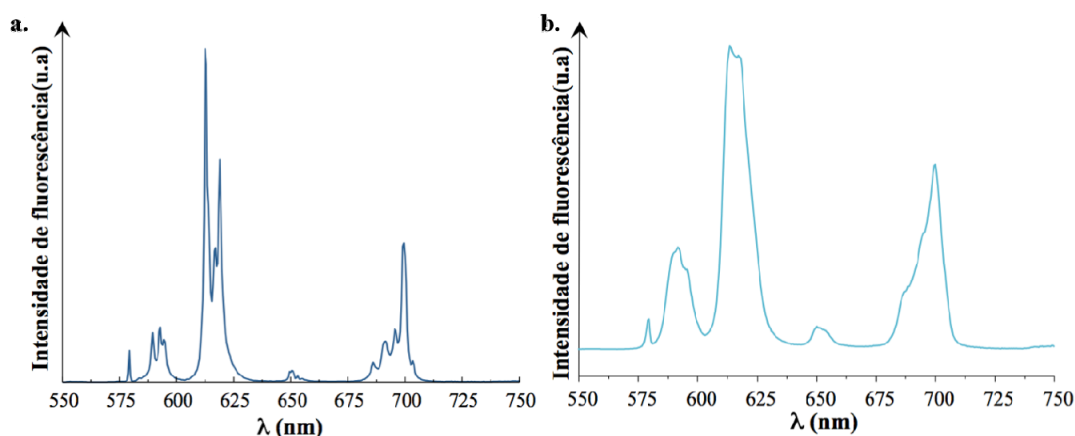


Figura 28. Caracterização das nanopartículas de sílica funcionalizadas com o complexo C1 e C2 (NPSC1 (a.) e NPSC2 (b.)) por fluorescência de estado sólido, à T_{amb} , com excitação a 342 e 290 nm, respectivamente.

Tal como anteriormente descrito para os outros sistemas, estes espectros são compostos unicamente por linhas estreitas atribuídas às transições entre o primeiro estado excitado e o estado fundamental, relativamente às orbitais f do európio (Eu).

3.3 Teste de actividade citotóxica *in vitro*

De acordo com todo o trabalho realizado anteriormente e depois de toda a caracterização efectuada tanto para o complexo C2 como para as nanopartículas funcionalizadas com o mesmo, o próximo estudo era um dos pontos importantes do trabalho, uma vez que era fulcral perceber-se se estas biosondas sintetizadas tinham efeitos nulos ou muito pequenos nas células, para que posteriormente sejam utilizadas como biosondas imagiológicas, em efeitos de contraste. É importante saber a viabilidade celular, ou actividade citotóxica, das nossas biosondas pois foram estes dados que nos permitiram retirar conclusões de modo a saber se o objectivo do trabalho poderia ser cumprido.

Neste trabalho foram utilizadas duas linhas celulares HeLa (adenocarcinoma cervical humano) e A549 (adenocarcinoma alveolar humano).

3.3.1 Células HeLa

A primeira linha celular utilizada foi a do adenocarcinoma cervical humano (HeLa). Com o intuito de determinar o valor de concentração inibitório de 50% do crescimento celular (IC_{50}) para as nanopartículas de ferro e sílica (NP-Fe, NPS) e das mesmas funcionalizadas (NP-FeC2, NPSC1, NPSC2), esta linha celular foi incubada em diferentes concentrações de amostra (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 μ M) por 48 h e depois foi realizado o ensaio do MTT. Este conhecido método colorimétrico reflecte o número de células viáveis e também é utilizado como medida de citotoxicidade (perda de células viáveis) [84] através da absorvência do roxo formazano (forma reduzida do amarelo do MTT).

A relação entre a viabilidade celular e a concentração do complexo C2, das NP-Fe, das NPS e das mesmas funcionalizadas, nas HeLa, estão representadas nas **Figuras 29, 30 e 31**, respectivamente.

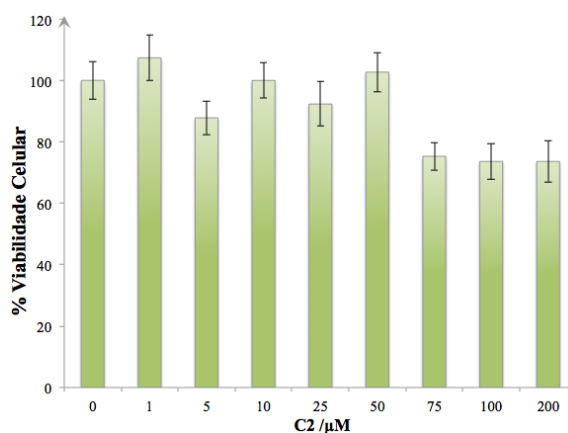


Figura 29. Teste citotóxico *in vitro* para o complexo de Fenantrolina+Európio+3-APTS (C2) em células HeLa depois de 48 h de incubação. O histograma representa a

relação entre a viabilidade celular e a concentração do complexo C2 (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 μM).

Pela figura anterior podemos observar que, mesmo para as concentrações de complexo mais elevada temos uma viabilidade celular de aproximadamente 80%, concluindo facilmente que o nosso complexo não apresenta um efeito nefasto nas células, provando que este pode vir a ser utilizado como biossonda sem afectar o funcionamento normal das células. Depois de obter estes primeiros resultados percebeu-se que, não seria necessário efectuar cálculos para o valor de IC_{50} , pois obtiveram-se valores muito elevados e o complexo apresentou-se praticamente inofensivo para as células.

Foi necessário então fazer o mesmo teste para as nanopartículas de ferro funcionalizadas com o complexo C2, como está representado seguidamente (**Figura 30**). De forma a abranger uma maior quantidade de concentrações diferentes foram realizadas duas microplacas, uma entre 500 a 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ e outra entre 200 e 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, para as NP-Fe e para as NP-FeC2.

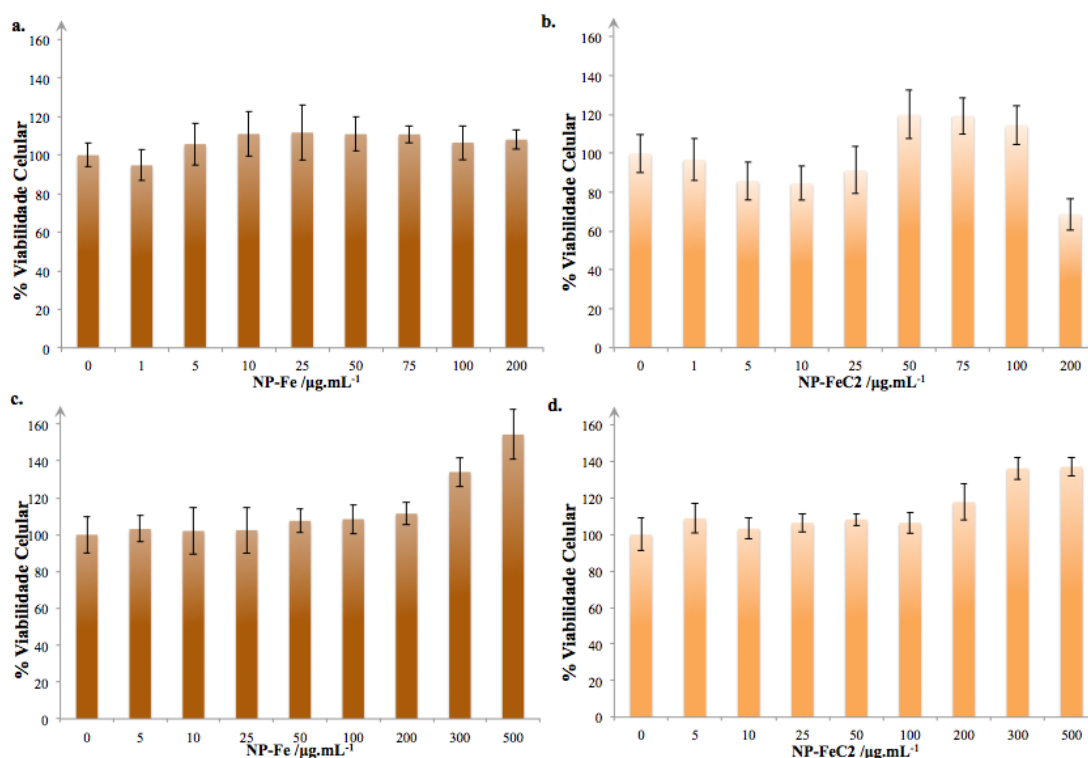


Figura 30. Testes citotóxicos *in vitro* para as nanopartículas de ferro (NP-Fe, **a.** e **c.**) e para as mesmas funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2, **b.** e **d.**) em células HeLa depois de 48 h de incubação. Os histogramas representam a relação entre a viabilidade celular e a concentração das NP-Fe/NP-FeC2 (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **a.** e **b.**, ou 5, 10, 25, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **c.** e **d.**).

Na **Figura 29** podemos observar que as nanopartículas de ferro tanto na microplaca de maior concentração (500 a 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) como na de menor concentração (200 a 1

$\mu\text{g.mL}^{-1}$) têm viabilidades celulares sempre constantes e não têm efeitos citotóxicos para as células. As diferenças observadas entre cada uma das concentrações da amostra são explicadas pela diferente variabilidade celular e pelo diferente crescimento das mesmas. Aquando da introdução da amostra NP-FeC2 nas células observa-se que a $200 \mu\text{g.mL}^{-1}$ parece existir um decréscimo da viabilidade celular para 80%, mas quando se repete o ensaio na microplaca de maior concentração percebe-se que a viabilidade celular se mantém e as NP-FeC2 não têm qualquer efeito sobre as células, não sendo novamente possível calcular valores de IC_{50} , apresentando-se assim como resultados positivos e promissores para o estudo. Seguiu-se o estudo das Nanopartículas de Sílica (NPS) e das mesmas funcionalizadas com os complexos C1 (NPSC1) e C2 (NPSC2), representados na **Figura 31**.

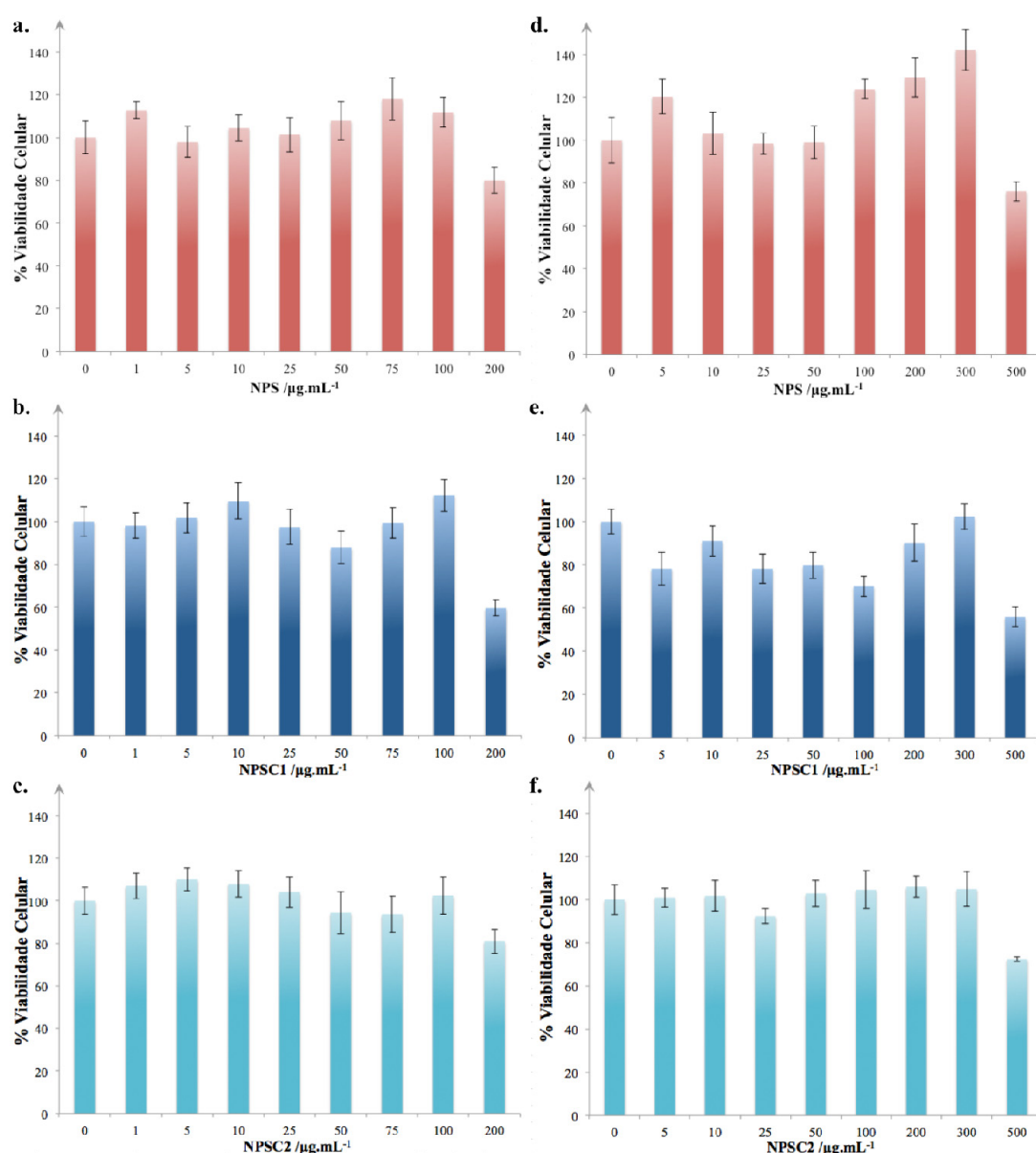


Figura 31. Testes citotóxicos *in vitro* para as nanopartículas de sílica (NPS, **a.** e **d.**) e para as mesmas funcionalizadas com o complexo C1 (NPSC1 **b.** e **e.**) e com o

complexo C2 (NPSC2, **c.** e **f.**) em células HeLa depois de 48 h de incubação. Os histogramas representam a relação entre a viabilidade celular e a concentração das NPS/NPSC1/NPSC2 (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **a.**, **b.** e **c.**, ou 5, 10, 25, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **d.**, **e.** e **f.**).

Pela observação dos dados obtidos podemos concluir novamente que a viabilidade celular não é, relativamente, afectada pelas NPS nem destas funcionalizadas tanto com o complexo C1 como com o complexo C2, mesmo quando se aumenta a concentração de amostra. As NPSC1 são as que obtêm uma viabilidade celular inferior, nas concentrações mais elevadas de cada microplaca, sendo este o primeiro dado que diferencia a síntese das NPS funcionalizadas, pois todos os dados de caracterização mostravam que ambas as sínteses tinham resultados muito semelhantes.

De modo a retirar conclusões mais facilmente e comparar os resultados entre os dois tipos de nanopartículas foi realizada uma tabela resumo (**Tabela 1**) com os valores de concentração de cada uma das amostras e de viabilidade celular. Nas concentrações iguais em cada uma das microplacas foi realizada uma média, uma vez que todas as condições de crescimento e manutenção são mantidas iguais.

Tabela 1. Sumário dos dados referentes à relação entre a viabilidade celular e a concentração das nanopartículas e das mesmas funcionalizadas, em células HeLa depois de 48 h de incubação.

	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Viabilidade Celular				
		NP-Fe	NP-FeC2	NPS	NPSC1	NPSC2
Células HeLa	500	154	137	76	56	72
	300	134	136	142	102	105
	200	110	113	119	99	107
	100	108	107	116	89	106
	75	111	119	118	99	94
	50	109	110	105	95	107
	25	107	109	105	95	102
	10	106	107	107	101	106
	5	107	110	116	95	106
	1	95	97	113	98	107
	0	100	100	100	100	100

Através da tabela concluímos que as NP-Fe e as NP-FeC2 têm valores muito promissores, uma vez que a viabilidade celular basicamente não é alterada, fazendo das mesmas biosondas magneto-fluorescentes muito promissoras, até uma concentração de 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o que é uma concentração extremamente elevada.

No que diz respeito às NPS estas não são muito diferentes das de ferro uma vez que a viabilidade celular só é afectada a uma concentração mais elevada, 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, o que nos leva concluir que estas também podem ser usadas como biosondas fluorescentes, pois não apresentam capacidades toxicológicas para as células até 300 $\mu\text{g.mL}^{-1}$.

3.3.2 Células A549

Depois de realizados os estudos para uma linha celular foi necessário utilizar uma nova linha celular para poder servir de ponto de comparação com as HeLa. Foi escolhida a linha celular do adenocarcinoma alveolar humano (A549).

Tal como para as células HeLa, pretendeu-se determinar um valor de IC_{50} para as mesmas amostras anteriormente testadas, sendo esta linha celular incubada em diferentes concentrações de amostra (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 μM) por 48 h e depois foi realizado o ensaio do MTT, para posteriormente se fazer a comparação entre as duas linhas celulares. A relação entre a viabilidade celular e a concentração do complexo C2, das NP-Fe, das NPS e das mesmas funcionalizadas, nas A549, estão representadas nas **Figuras 32, 33 e 34**, respectivamente.

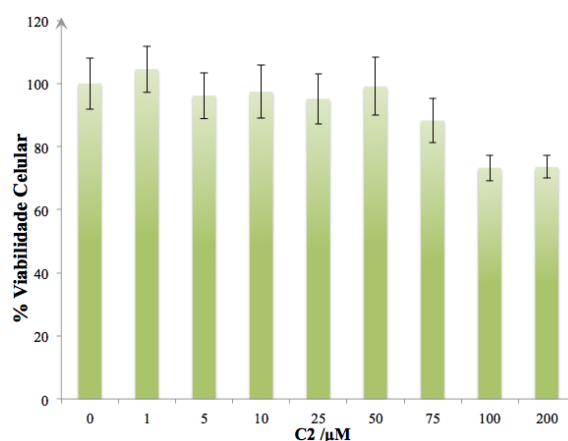


Figura 32. Teste citotóxico *in vitro* para o complexo de Fenantrolina+Európio+3-APTS (C2) em células A549 depois de 48 h de incubação. O histograma representa a relação entre a viabilidade celular e a concentração do complexo C2 (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 μM).

Pela figura anterior podemos observar que, mesmo para as concentrações de complexo mais elevada temos uma viabilidade celular de aproximadamente 80%, concluindo facilmente que o nosso complexo não apresenta um efeito nefasto nas células, provando que este pode vir a ser utilizado como biosonda, sem afectar o funcionamento normal das células. Tal como no caso das células HeLa, não foi possível realizar o cálculo do valor de IC_{50} , uma vez que novamente o complexo não apresentou efeitos citotóxicos nas células. Sendo este resultado semelhante ao obtido nas células HeLa, pode-se afirmar que o complexo C2 tem um efeito igual nas células, não existindo assim diferenças de crescimento.

Foi necessário então fazer o mesmo teste para as nanopartículas de ferro funcionalizadas com o complexo C2, como está representado seguidamente (**Figura 33**). De forma a abranger uma maior quantidade de concentrações diferentes foram realizadas duas microplacas, uma entre 500 a 5 $\mu g.mL^{-1}$ e outra entre 200 e 1 $\mu g.mL^{-1}$, para as NP-Fe e para as NP-FeC2.

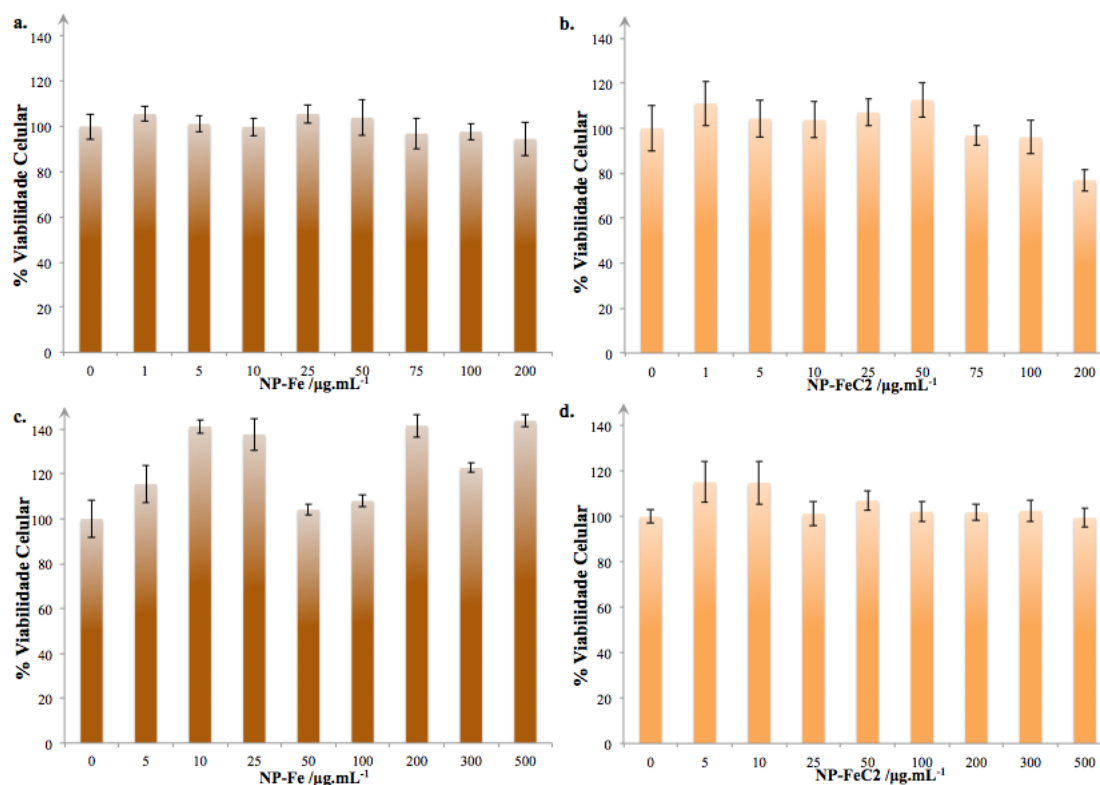


Figura 33. Testes citotóxicos *in vitro* para as nanopartículas de ferro (NP-Fe, **a.** e **c.**) e para as mesmas funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2, **b.** e **d.**) em células A549 depois de 48 h de incubação. Os histogramas representam a relação entre a viabilidade celular e a concentração das NP-Fe/NP-FeC2 (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **a.** e **b.**, ou 5, 10, 25, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **c.** e **d.**).

Na **Figura 33** podemos observar que as nanopartículas de ferro tanto na microplaca de maior concentração (500 a 5 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) como na de menor concentração (200 a 1 $\mu\text{g.mL}^{-1}$) têm viabilidades celulares sempre constantes e não têm efeitos citotóxicos para as células. As diferenças observadas entre cada uma das concentrações da amostra, como existe na **Figura 33.c.**, são explicadas pela diferente variabilidade celular e pelo diferente crescimento das mesmas. Aquando da introdução da amostra NP-FeC2 nas células observa-se que a 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$ parece existir um decréscimo da viabilidade celular para 90%, mas quando se repete o ensaio na microplaca de concentração mais elevada percebe-se que a viabilidade celular se mantém e as NP-FeC2 não têm qualquer efeito sobre as células, não sendo novamente necessário calcular valores de IC_{50} , apresentando resultados positivos para o estudo. Todos estes resultados obtidos estão em concordância com os obtidos para a linha celular anterior, observando-se novamente que a proliferação celular não é afectada por estes materiais.

Em seguida realizou-se o estudo das nanopartículas de sílica (NPS) e das mesmas funcionalizadas com o complexo C1 (NPSC1) e com o complexo C2 (NPSC2), representados na **Figura 34**.

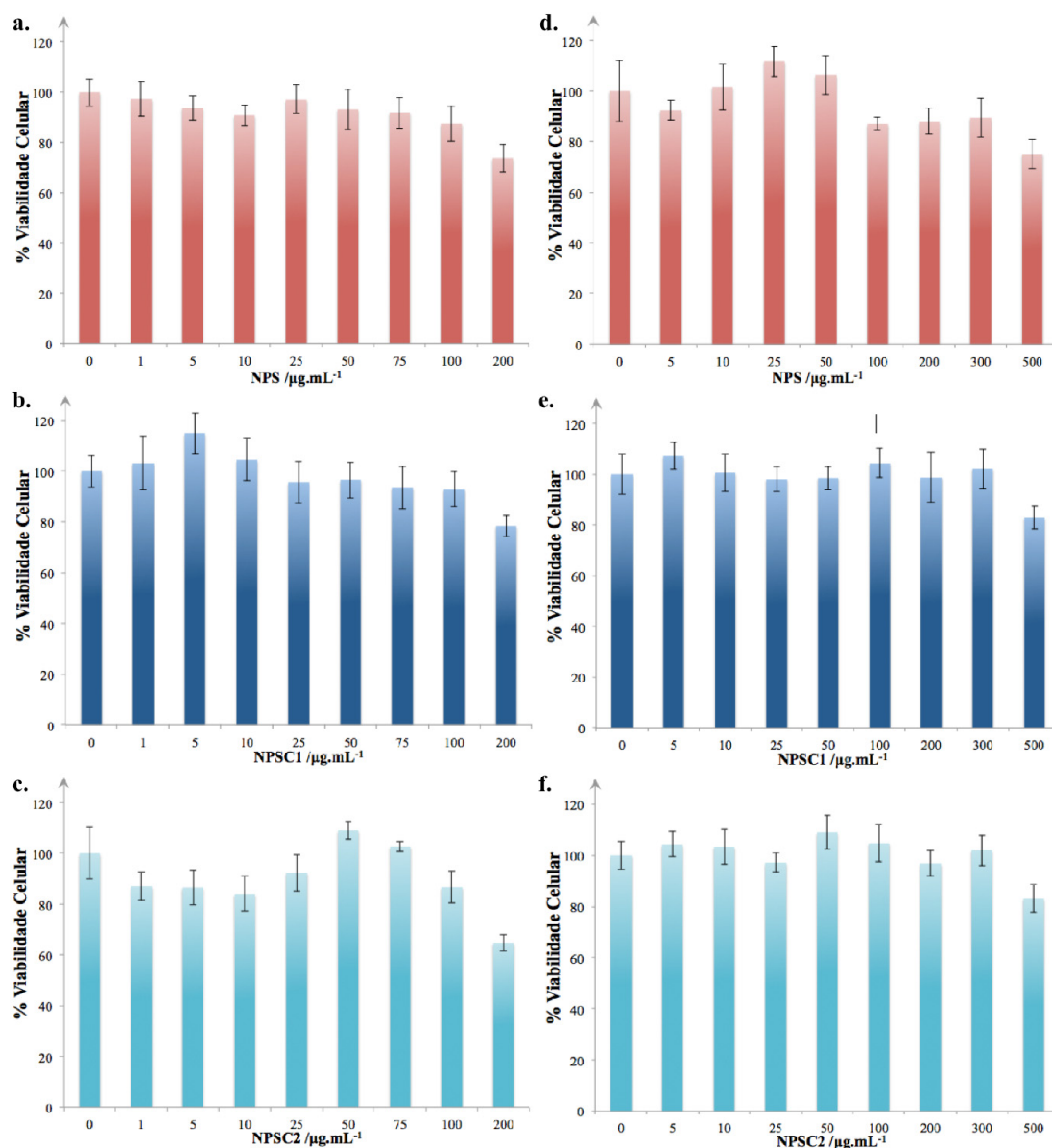


Figura 34. Testes citotóxicos *in vitro* para as nanopartículas de sílica (NPS, **a.** e **d.**) e para as mesmas funcionalizadas com os complexos C1 (NPSC1 **b.** e **e.**) e C2 (NPSC2, **c.** e **f.**) em células A549 depois de 48 h de incubação. Os histogramas representam a relação entre a viabilidade celular e a concentração das NPS/NPSC1/NPSC2 (1, 5, 10, 25, 50, 75, 100 e 200 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **a.**, **b.** e **c.**, ou 5, 10, 25, 50, 100, 300 e 500 $\mu\text{g.mL}^{-1}$, **d.**, **e.** e **f.**).

Pela observação dos dados obtidos podemos concluir que se manteve a mesma tendência quando esta linha celular foi exposta às NPS, bem como com as funcionalizadas tanto com o complexo C1, como com o complexo C2, mesmo quando se aumentou a concentração de amostra. Contrariamente à linha celular anterior, as NPSC1 não tem uma diferença tão notória, apresentando viabilidades celulares de aproximadamente 80% nas concentrações mais elevadas de cada microplaca, voltando-se a obter resultados semelhantes para os dois tipos de NPS funcionalizadas.

De modo a retirar conclusões mais facilmente e comparar os resultados entre os dois tipos de nanopartículas foi novamente realizada uma tabela resumo (**Tabela 2**) com os valores de concentração de cada uma das amostras e de viabilidade celular. Nas concentrações iguais em cada uma das microplacas foi realizada uma média, uma vez que todas as condições de crescimento e manutenção são mantidas iguais.

Tabela 2. Sumário dos dados referentes à relação entre a viabilidade celular e a concentração das nanopartículas e das mesmas funcionalizadas, em células A549 depois de 48 h de incubação.

	Concentração ($\mu\text{g.mL}^{-1}$)	% Viabilidade Celular				
		NP-Fe	NP-FeC2	NPS	NPSC1	NPSC2
Células A549	500	144	99	75	83	83
	300	123	103	89	102	102
	200	118	98	91	97	96
	100	101	98	91	99	100
	75	97	97	92	94	103
	50	104	106	105	101	107
	25	121	103	108	101	101
	10	123	109	103	102	104
	5	110	110	98	106	104
	1	106	111	97	103	87
	0	100	100	100	100	100

Através da tabela concluímos que as NP-Fe e as mesmas funcionalizadas têm valores muito promissores, uma vez que a viabilidade celular basicamente não foi alterada, mesmo com o aumento de concentração de amostra, obtendo-se valores ligeiramente mais baixos quando funcionalizadas, tal como anteriormente para as células HeLa, e este facto torna as mesmas como biosondas magneto-fluorescentes muito promissoras, até uma concentração de $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Este resultado é confirmado pelo facto de se terem obtido valores muito semelhantes para ambas as linhas celulares.

No que diz respeito às NPS não apresentaram resultados muito diferentes das de ferro uma vez que a viabilidade celular só foi afectada (\approx menos 20% de viabilidade celular) à concentração mais elevada, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que nos levou a concluir que estas também poderão ser biosondas fluorescentes a ter em consideração, pois não apresentam capacidades toxicológicas para as células até $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$. Novamente, um resultado que está de acordo com a linha celular HeLa, confirmando a compatibilidade destes materiais com as células.

3.3.3 Estudos de Fluorescência em células

Depois de obtidos os resultados positivos relativamente à toxicidade dos materiais foi necessário recorrer a estudos de fluorescência, de modo a saber se a fluorescência dos complexos se mantinha. Tal como já foi realizado anteriormente para o complexo de Fenantrolina+Európio+3-APTS (C2) e para as nanopartículas funcionalizadas tanto com o complexo de Fenantrolina+Európio (C1) como com o C2, o estudo foi realizado utilizando o mesmo método, tanto de actividade celular como de estudo de fluorescência. O ensaio foi realizado utilizando células HeLa, incubadas a 37 °C, durante 2 h e foi utilizado como branco as células em meio de crescimento e o complexo C2. Os comprimentos de onda de excitação utilizados foram os mesmos já utilizados 264 nm (**Figura 35**) e 288 nm (**Figura 36**).

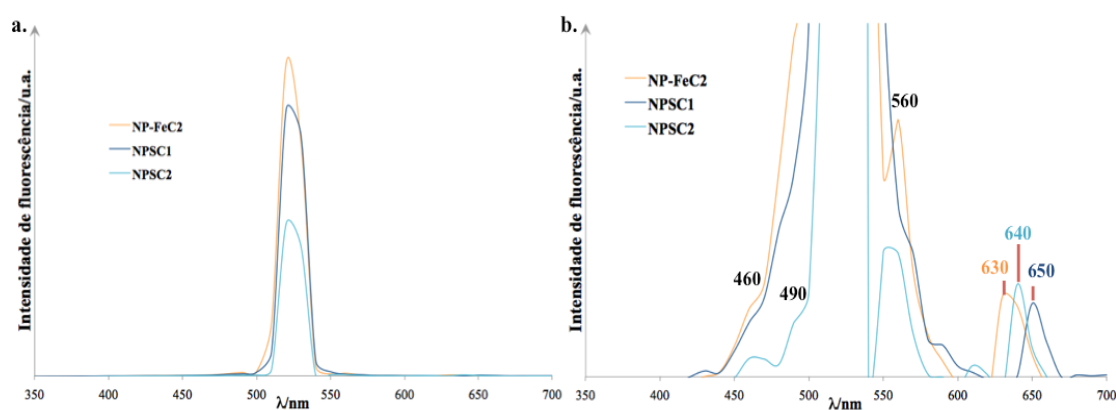


Figura 35. Espectro de fluorescência das nanopartículas de ferro funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2) e das nanopartículas de sílica funcionalizadas com os complexos C1 (NPSC1) e C2 (NPSC2) (a.) e ampliação dos mesmos espectros de fluorescência (b.), ambos correspondem à excitação da amostra a 264 nm.

Através da análise da figura anterior podemos observar novamente na **Figura 35.a.** o sinal originado pela difusão de 2.^a ordem do aparelho a 528 nm e como tal foi necessário ampliar a intensidade de fluorescência obtendo os picos característicos do complexo C2, tal como já tínhamos obtido sem estar na presença de células. Os picos característicos mantêm-se próximos sofrendo alguns desvios devido a uma possível ligação/incorporação das nanopartículas funcionalizadas nas células, obtendo λ_{em} característicos de 560 nm e 630, de 640 e de 650 nm, respectivamente para os nanomateriais NP-FeC2, NPSC2 e NPSC1.

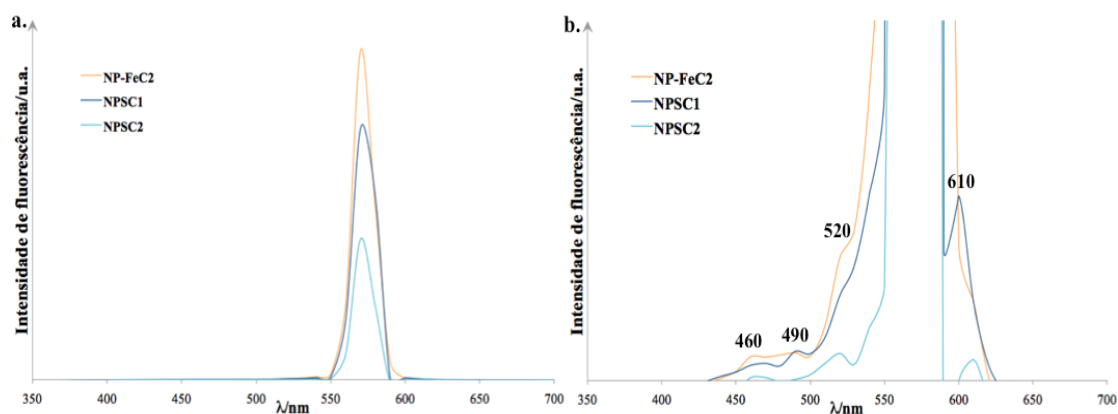


Figura 36. Espectro de fluorescência das nanopartículas de ferro funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2) e das nanopartículas de sílica funcionalizadas com os complexos C1 (NPSC1) e C2 (NPSC2) (a.) e ampliação dos mesmos espectros de fluorescência (b.), ambos correspondem à excitação da amostra a 288 nm.

Tal como na figura anterior, **Figura 36.a.** observamos o efeito do aparelho ao comprimento de onda 576 nm e foi necessário realizar uma ampliação da escala (**Figura 36.b.**), obtendo-se a 460 e 490 nm novamente picos, tal como na **Figura 35.b.**. Uma vez que este não se alterou a diferente λ_{exc} observou-se que correspondia ao ligando 3-APTS, sendo que este não é influenciado pelas células pois apresenta o mesmo pico a 460 nm, como se pode observar pela **Figura 26**. No que diz respeito aos picos característicos do complexo C2 são iguais em todas as nanopartículas e mantêm-se muito semelhantes aos estudos de fluorescência sem células, a 520 e 610 nm, comprimentos de onda correspondentes ao európio.

Com estas duas figuras podemos observar que as características fluorescentes do complexo C2 foram mantidas, mesmo depois de se funcionalizar as nanopartículas de ferro ou de sílica, com o complexo, mesmo quando os nanomateriais são postos em contacto com as células. A partir desta conclusão podemos afirmar que os materiais sintetizados têm capacidade de biosondas magneto fluorescente no caso das NP-Fe e fluorescentes no caso das NPS.

CAPÍTULO 4

Conclusão e Perspectivas Futuras

Conclusão

O presente trabalho teve como objectivos a preparação de nanopartículas de ferro e sílica funcionalizadas com complexos de európio com aplicação em imagiologia, como biosondas fluorescentes. Obtendo assim um material magneto-fluorescente e outro fluorescente como materiais de transporte/suporte dos complexos de európio (Eu) e fenantrolina (Phe).

4.1 Síntese e caracterização dos nanomateriais utilizados

Numa primeira fase foram preparados os complexos de európio e fenantrolina **C0** (Eu+Phe (1:1)), **C1** (Eu+Phe (1:2)) e **C2** (Eu+Phe+3-APTS) de modo a obter as novas sondas biofluorescentes. Depois de efectuar todas as caracterizações recorrendo à técnica de espectroscopia vibracional de infravermelho com transformada de Fourier (FTIR) todos os complexos apresentavam as bandas características dos modos vibracionais. Em seguida, prosseguiu-se para o estudo de UV-Vis do complexo C2, obtendo-se dois picos a 264 e 288 nm. Estes comprimentos de onda foram os escolhidos para excitar o complexo C2, no estudo de fluorescência do complexo, obtendo os picos correspondentes ao ligando, 3-APTS a 362 e 360 nm, à antenna, fenantrolina a 490 e 525 nm, e ao metal, európio a 615 e 630 nm, respectivamente para os comprimentos de excitação 264 e 288 nm. Concluindo que a excitação indirecta do Lantanídeo (Eu) por via da antenna (Phe) foi conseguida com sucesso. Na fluorescência de estado sólido (excitação directa ao európio) o espectro de emissão é composto unicamente por linhas estreitas atribuídas às transições entre o primeiro estado excitado e o estado fundamental, relativamente às orbitais f do Eu. Através destes dados podemos concluir que os processos de transferência de energia do ligando → metal nos complexos são eficientes.

Seguidamente, foram funcionalizadas as nanopartículas de ferro (NP-Fe) utilizando dois tipos de síntese, utilizando o complexo C1 e C2. No caso da síntese em que se utilizou o complexo C1, estas quando expostas a uma lâmpada de luz ultravioleta (365 nm) não apresentaram fluorescência e como tal não se prosseguiu os estudos com as mesmas. Contrariamente, as NP-Fe funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2) apresentaram fluorescência, como já tinha sido realizado anteriormente para os complexos recorreu-se à técnica de espectroscopia de FTIR de modo a caracterizar as mesmas, obtendo-se as bandas atribuídas ao modo $\nu_{\text{Fe-O}}$ (755 cm^{-1}), ao modo $\nu_{\text{Si-O}}$ (1060 cm^{-1}) devido ao revestimento em sílica, ao modo $\nu_{\text{N-H}}$ ($3500\text{-}3300 \text{ cm}^{-1}$) do grupo funcional das aminas, ao modo $\nu_{\text{C=N}}$ ($1680\text{-}1610 \text{ cm}^{-1}$) da amina no anel aromático e ao modo $\nu_{\text{C=Caromático}}$ ($1600\text{-}1500 \text{ cm}^{-1}$) dos carbonos aromáticos. As nanopartículas sintetizadas foram, ainda, caracterizadas por difracção de raios-X de pós (DRX), mostrando que estão presentes cinco reflexões, permitindo-nos concluir que as mesmas são magnetite (Fe_3O_4). Em seguida procedeu-se a uma análise de termogravimetria (TGA) obtendo uma perda inicial de aproximadamente 4% da

massa da amostra NP-Fe, correspondente à água adsorvida à superfície das nanopartículas, para a amostra NP-FeC2 obtiveram-se dois patamares, um correspondente à água e uma perda de cerca de 0.4 mg correspondente ao complexo C2. Com o objectivo de caracterizar morfológicamente as NP-Fe, recorreu-se à técnica de microscopia electrónica de transmissão (TEM) obtendo-se o diâmetro das mesmas, sendo este de 30 nm, e à técnica de microscopia electrónica de varrimento (SEM) revelando que as nanopartículas apresentam uma morfologia esférica e esponjosa. Nenhuma destas características foi alterada depois da funcionalização, permitindo-nos concluir que estas poderão ser utilizadas como biosondas uma vez que têm o tamanho adequado para efectuar a passagem pela barreira hemato-encefálica e a funcionalização foi efectuada com sucesso. Obteve-se ainda, por análise elementar, a %Eu que se ligou às NP-Fe, sendo esta de 6.71%, um bom resultado para utilizar as mesmas como biosondas, *bimodais* [59], magneto-fluorescentes.

Prosseguiu-se então com a sintetização das nanopartículas de sílica (NPS), e tal como anteriormente, utilizaram-se dois tipos de sínteses para a funcionalização das mesmas, uma com o complexo C1 e outra com o complexo C2 e ambas foram colocadas sob uma luz ultravioleta (365 nm) e emitiram fluorescência com emissão no visível, daí que o estudo tenha prosseguido com ambas, NPSC1 e NPSC2. Através do método inicial o rendimento da síntese das nanopartículas apresentou um valor não muito elevado e procedeu-se a uma nova síntese obtendo nanopartículas com um maior diâmetro, denominadas como NPSg, tamanho confirmado através de TEM, 500 nm, enquanto as NPS tinham um diâmetro de 50 nm. Por SEM confirmou-se que ambas, NPS e NPSg apresentam uma morfologia esférica e bem denotada. Quando as NPS e as NPSg foram funcionalizadas tanto com o complexo C1, como com o complexo C2 apresentavam a mesma morfologia e os diâmetros iguais. No que diz respeito às NPSg, o seu grande diâmetro pode vir a influenciar negativamente o uso das mesmas como biosondas, uma vez que nanopartículas com tamanho superior a 200 nm ficam retidas e não passam a barreira hemato-encefálica. Este dado comprova que esta síntese não é adequada para o estudo em questão. Tal como foi realizado para as NP-Fe, recorreu-se às mesmas técnicas de caracterização, espectroscopia de FTIR, obtendo as bandas características, e por DRX, os difractogramas para ambos os tipos de nanopartículas (NPS e NPSg) apresentam uma reflexão com perfil largo, com uma forma de bossa (material amorfo) a $2\theta = 22.5^\circ$, apresentando uma diminuição de intensidade à medida que as nanopartículas vão sendo funcionalizadas. Os estudos prosseguiram apenas com as NPS (menor diâmetro), pois ambas têm o mesmo comportamento, estrutura e caracterização. Por último procedeu-se à TGA, obtendo resultados semelhantes às NP-Fe, para as NPS, NPSC1 e NPSC2. Todas têm uma perda inicial correspondente ao solvente metanol utilizado na síntese e à água adsorvida à superfície das nanopartículas. No que diz respeito às NPSC1 e NPSC2 apresentam, tal como as NP-FeC2, dois patamares, um já explicado e o outro correspondente aos complexos em questão, obtendo-se uma perda de 0.33 mg correspondente ao complexo C1 (NPSC1) e uma perda de 0.45 mg correspondente ao complexo C2 (NPSC2), concluindo que o complexo C2 se ligou em maior

quantidade. Por análise elementar analisou-se a %Eu em cada uma das amostras NPSC1 e NPSC2, obtendo-se 3.15% e 5.05%, respectivamente. Através destes dados todos, podemos concluir que a síntese em que se utiliza o complexo C2 tem uma maior quantidade de európio ligado às NPS e que apesar de ser ligeiramente inferior às NP-Fe é o suficiente para que as NPS possam funcionar com o objectivo pretendido, como biosondas fluorescentes.

Para finalizar os estudos de caracterização procedeu-se ao estudo da fluorescência das nanopartículas funcionalizadas, tanto de ferro como sílica. Os comprimentos de excitação utilizados foram os estabelecidos anteriormente pelo complexo C2, 264 e 288 nm. Procedeu-se novamente a uma excitação indirecta por parte do efeito de antena para as NP-FeC2, NPSC1 e NPSC2, obtendo-se valores muito similares para todas as amostras, podendo observar-se tanto para o $\lambda_{exc} = 264$ nm como 288 nm, os picos correspondentes ao 3-APTS, a 420 e 460 nm, diferentes dos obtidos anteriormente (362 e 360 nm) devido à ligação às nanopartículas. Para o $\lambda_{exc} = 264$ nm, obteve-se o pico característico do Eu a 610, 620 e 630 nm, respectivamente, para as NP-FeC2, NPSC2 e NPSC1. Para o $\lambda_{exc} = 288$ nm, obteve-se ainda o pico a, aproximadamente, 550 nm para todas as amostras correspondente a uma transferência de energia específica do complexo C2 devido à antena, Phe e existe um desvio das bandas específicas de Eu, tal como já tinha acontecido anteriormente para o complexo C2. Aquando do estudo da fluorescência em estado sólido, com excitação directa do lantanídeo em questão (Eu), o espectro de emissão tanto das NP-FeC2, como das NPSC1 e das NPSC2 é composto por linhas estreitas atribuídas às transições energéticas entre o primeiro estado excitado e o estado fundamental, relativamente às orbitais f do európio (Eu).

4.2 Testes celulares

Depois de toda a caracterização dos materiais fundamentais para a criação das novas biosondas fluorescentes é necessário testar a toxicidade das mesmas, de modo a poder revogar o uso do gadolínio (agente de contraste actualmente utilizado) devido à sua toxicidade e possível relação de causa com Fibrose Sistémica Nefrogénica (NSF) [61]. Como tal foram utilizadas duas linhas celulares, HeLa (adenocarcinoma cervical humano) e A549 (adenocarcinoma alveolar humano).

Para as células HeLa concluímos que as NP-Fe e as NP-FeC2 têm valores de viabilidade celular de aproximadamente 100%, podendo assim as NP-FeC2 ser biosondas, *bimodais*, magneto-fluorescentes muito promissoras, até uma concentração elevada $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, não tendo qualquer tipo de toxicidade para com estas células. No caso das NPS e das NPSC1 e NPSC2 não obtivemos valores muito diferentes, uma vez que a viabilidade celular só é afectada a uma concentração mais elevada, $500 \mu\text{g.mL}^{-1}$, o que nos leva a concluir que estas podem ser usadas como biosondas fluorescentes, pois não apresentam toxicidade para as células até $300 \mu\text{g.mL}^{-1}$.

Para as células A549 as conclusões retiradas para qualquer uma das nanopartículas, ferro ou sílica, ou para as mesmas funcionalizadas são praticamente iguais e têm valores de viabilidade celular muito semelhante, o que nos permitiu assim concluir que as novas biosondas colocadas a teste têm um futuro promissor, uma vez que não tem qualquer toxicidade para as células.

Outro campo muito importante de testar era saber se a fluorescência se mantinha quando as mesmas são introduzidas nas células (linha celular HeLa), recorrendo-se assim a estudos de fluorescência em meio celular. Os comprimentos de onda de excitação indirecta do európio, utilizados foram novamente os mesmo 264 e 288 nm. Para o $\lambda_{exc} = 264$ nm obtiveram-se picos aos comprimentos de onda correspondentes ao 3-APTS a 460 (NP-FeC2 e NPSC1) e 490 nm (NPSC2), e correspondentes à antena (Phe) a 560 nm, que não era visível no estudo sem ser em meio celular. Finalmente os picos correspondentes ao európio são observados a 630 (NP-FeC2), 640 (NPSC2) e 650 nm (NPSC1). Estes últimos sofrem um ligeiro desvio do comprimento de emissão do európio encontrados na literatura, devido a uma possível ligação/incorporação das nanopartículas funcionalizadas nas células. Para o $\lambda_{exc} = 288$ nm obtiveram-se novamente os picos do 3-APTS (460 e 490 nm para todas as amostras), da antena (Phe, 520 nm para todas as amostras) e do Európio que não sofre nenhum desvio da literatura apresentando um pico a 610 nm para todas as amostras.

Por todos estes resultados podemos assim concluir que as características fluorescentes do complexo C2 foram mantidas, mesmo depois de se funcionalizar as nanopartículas de ferro ou de sílica, com o complexo quando os nanomateriais são postos em contacto com as células. Podemos então afirmar que o objectivo principal deste trabalho foi realizado com sucesso, uma vez que foi criada uma biosonda magneto-fluorescente (bimodal, NP-FeC2) e duas biosondas fluorescentes (NPSC1 e NPSC2). Todas apresentam toxicidade nula para as células e mantêm o seu carácter fluorescente, sendo assim solução menos tóxica e mais viável economicamente comparativamente com o gadolínio (Gd), mas muito trabalho ainda tem de ser realizado para que estas possam ser testadas.

4.3 Perspectivas Futuras

De forma a melhor compreender o mecanismo de actuação dos nanomateriais (biosondas) nas células teria sido muito interessante e vantajoso realizar também outro tipo de ensaios. Será então essencial compreender de que forma estes actuam nas células, se entram na sua totalidade, se sofre alguma alteração química, como hidrólise, por exemplo, e de que forma interacciona com o DNA. Para isso os estudos de microscopia de fluorescência com filtros adequados a estas sondas, citometria de fluxo ou estudos de ligação com o DNA.

Será importante perceber qual a localização intracelular das biosondas de modo a poder caracterizá-las numa das classes, lisossomal, mitocondrial ou manchas nos nucléolos. A partir desta localização poderíamos utilizar estas biosondas não só em

imagiologia (MRI) em termos de detecção, mas também como transportadoras de fármacos.

Outra eventual utilização e estudo para estas biosondas, será perceber qual o efeito destas biosondas em células normais/saudáveis (fibroblastos), para que o estudo fique completo a nível de citotoxicidade.

CAPÍTULO 5

Bibliografia

Bibliografía

- [1] C. Binns, Introduction to Nanoscience and Nanotechnology, John Wiley&Sons, Inc., (2010);
- [2] R. Langer, *Acc. Chem. Res.*, **33** (2000), 94-101;
- [3] V. Mohanraj, Y. Chen, *Tropical Journal of Pharmaceutical Research*, **5** (2006), 561-573;
- [4] M. Lee, S. Kim, *Pharmaceutical Research*, **22** (1) (2005), 1-13;
- [5] V. Cabuil, Magnetic Nanoparticles: Preparation and Properties, Roldan group publications, **Capítulo 119** (2004);
- [6] A. Lu, E. Salabas, F. Schüth, *Angew Chem Int*, **46** (2007), 1222-1244;
- [7] S. Moghimi, A. Hunter, J Murray, *Pharmacol Rev*, **53** (2001), 283-318;
- [8] A. Akbarzadeh, M. Samiei, S. Davaran, *Nanoscale Research Letters*, **7** (2012), 144-157;
- [9] A. Pfeifer, K. Zimmermann, C. Plank, *Pharm Res*, **29** (2012), 1161-1164;
- [10] C. Plank, O. Zelphati, O. Mykhaylyk, *Adv Drug Deliv Rev*, **63** (2011), 1300-1331;
- [11] M. Chorny, I. Fishbein, S. Forbes, I. Alferiev, *IUBMB Life*, **63** (2011), 613-620;
- [12] J. Lim, S. Ha, J. Lee, *Bull. Korean Chem. Soc.*, **33** (2012), 1067-1070;
- [13] G. Bhakta, R. Sharma, N. Gupta, S. Cool, V. Nurcombe, A. Maitra, *Nanomedicine*, **7** (2011), 472-479;
- [14] Y. Jin, S. Lohstretr, D. Pierce, J. Parisien, M. Wu, C. Hall III, J. Zhao, *Chem. Mater.* **20** (2008), 4411-4419;
- [15] X. Zhao, L. Hilliard, K. Wang, W. Tan, Encyclopedia of Nanoscience and Nanotechnology, American Scientific Publishers, (2004);
- [16] C. Kresge, M. Leonowicz, W. Roth, J. Vartuli, J. Beck, *Nature*, **359** (1992), 710;
- [17] Y. Lin. C. Haynes, *Chem. Mater.*, **21** (2009), 3979-3986;
- [18] X. He, H. Nie, K. Wang, W. Tan, X. Wu, P. Zhan, *Anal. Chem.*, **80** (2008), 9597-9603;
- [19] R. Kumar, I. Roy, T. Ohulchanskyy, L. Goswami, A. Bonoiu, E. Bergey, K. Trampusch, A. Maitra, P. Prasad, *ACS Nano*, **2** (2008), 449-456;
- [20] F. Barandeh, P. Nguyen, R. Kumar, G. Iacobucci, M. Kuznicki, A. Kosterman, E. Bergey, P. Prasad, S. Gunawardena, *PLoS ONE*, **7** (2012), 1-15;

- [21] I. Klejbor, E. Stachowiak, D. Bharali, I. Roy, I. Spodnik, J. Morys, E.J. Bergey, P. Prasad, M. Stachowiak, *Journal of Neuroscience Methods*, **165** (2007), 230-243;
- [22] R. Subbiah, M. Veerapandian, K. Yun, *Current Medicinal Chemistry*, **17** (2010), 4559-4577;
- [23] J. Weingart, P. Vabbilisetty, X. Sun, *Advances in Colloid and Interface Science*, **197-198** (2013), 68-84;
- [24] X. Zhao, L. Hilliard, S. Mechery, Y. Wang, R. Bagwe, S. Jin, W. Tan, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **101** (2004), 15027-15032;
- [25] D. Luo, E. Han, N. Belcheva, W. Saltzman, *Journal of Controlled Release*, **95** (2004), 333-341;
- [26] S. Santra, H. Yang, D. Dutta, J. Stanley, P. Holloway, W. Tan, B. Moudgil, R. Mericle, *Chem. Commun.*, **24** (2004), 2810-2811;
- [27] S. Kim, T. Ohulchanskyy, H. Pudavar, R. Pandey, P. Prasad, *J Am Chem Soc.*, **129** (2007), 2669-2675;
- [28] D. Bharali, I. Klejbor, E. Stachowiak, P. Dutta, I. Roy, N. Kaur, E. Bergey, P. Prasad, M. Stachowiak, *Proc Natl Acad Sci U S A*, **102** (2005), 11539-11544;
- [29] S. Cotton, Lanthanide and Actinide chemistry, *John Wiley & Sons Ltd*, 6.^a Edição (2006);
- [30] N. Greenwood, A. Earnshaw, Chemistry of the Elements, *Reed Educational and Professional Publishing Ltd*, 2.^a Edição (1997);
- [31] L. Prodi, *New J Chem*, **29** (2005), 20-31;
- [32] A. Cockerill, G. Davies, R. Harden, D. Rackham, *Chem Rev*, **73** (1973), 553-588;
- [33] L. Martin, M. Hahnke, M. Nitz, J. Wahnert, N. Silvaggi, K. Allen, H. Schwalbe, B. Imperiali, *J Am Chem Soc*, **129** (2007), 7106-7113;
- [34] H. Rashid, K. Yu, J. Zhou, *Journal of Structural Chemistry*, **54** (2013), 223-249;
- [35] J. Bünzli, C. Piguet, *Chemical Society Reviews*, **34** (2005), 1048-1077;
- [36] A. Hagan, T. Zuchner, *Anal Bioanal Chem*, **400** (2011), 2847-2864;
- [37] A. Thibon, V. Pierre, *Anal Bioanal Chem*, **394** (2009), 107-120;
- [38] J. Feng, H. Zhang, *Chem. Soc. Rev.*, **42** (2013), 387-410;
- [39] H. Xu, K. Yin, W. Huang, *Chem. Eur. J.*, **13** (2007), 10281-10293;
- [40] H. Xu, K. Yin, W. Huang, *J. Phys. Chem. C*, **114** (2010), 1674-1683;
- [41] L. Huang, B. Ma, C. Huang, T. Mak, G. Yao, G. Xu, *Journal of Coordination Chemistry*, **54** (2001), 95-103;

- [42] T. Steinkamp, U. Karst, *Anal Bioanal Chem*, **380** (2004), 24-30;
- [43] S. Weissman, *J Chem Phys*, **10** (1942), 214-217;
- [44] J. Emsley, *An A-Z Guide to the Elements*, *Oxford Univerty Press*, 2.^a Edição (2011);
- [45] E. Beaurepaire, V. Buissette, M. Sauviat, D. Giaume, K. Lahlil, A. Mercuri, *Nano Lett*, **4** (2004), 2079-2083;
- [46] J. Gałęzowska, R. Janicki, H. Kozłowski, A. Mondry, P. Młynarz, Ł. Szyrwił, *European Journal of Inorganic Chemistry*, **2010** (2010), 1696–1702;
- [47] R. Dickins, D. Parker, J. Bruce, D. Tozer, *Dalton Trans*, (2003), 1264-1271;
- [48] P. Bag, U. Flörke, K. Nag, *Dalton Transactions*, (2006), 3236–3248;
- [49] H. Xu, K. Yin, W. Huang, *Synthetic Metals*, **160** (2010), 2197–2202;
- [50] H. Härmä, C. Graf, P. Hänninen, *Journal of Nanoparticle Research*, **10** (2008), 1221–1224;
- [51] S. Gago, J. Fernandes, J. Rainho, R. Sá Ferreira, M. Pillinger, A. Valente, T. Santos, L. Carlos, P. Ribeiro-Claro, I. Gonçalves, *Chemistry of Materials*, **17** (2005), 5077–5084;
- [52] S. Pandya, J. Yu, D. Parker, *Dalton Trans*, (2006), 2757-2766;
- [53] J. Yuan, G. Wang, *Trends in Analytical Chemistry*, **25** (2006), 490-500;
- [54] L. Pålsson, R. Pal, B. Murray, D. Parker, A. Beeby, *Dalton Trans*, (2007), 5726-5734;
- [55] B. Murray, E. New, R. Pal, D. Parker, *Org. Biomol. Chem.*, **6** (2008), 2085–2094;
- [56] R. Pal, D. Parker, *Org. Biomol. Chem.*, **6** (2008), 1020-1033;
- [57] C. Montgomery, B. Murray, E. New, R. Pal, D. Parker, *Accounts of Chemical Research*, **42** (2009), 925-937;
- [58] M. Mahmoudi, H. Hosseinkhani, M. Hosseinkhani, S. Boutry, A. Simchi, W. Journeay, K. Subramani, S. Laurent, *Chem. Rev.*, **111** (2011), 253–280;
- [59] C. Wang, L. Cheng, Z. Liu, *Biomaterials*, **32** (2011), 1110-1120;
- [60] S. Pinho, H. Faneca, C. Geraldes, J. Rocha, L. Carlos, M. Delville, *Eur. J. Inorg. Chem.*, (2012), 2828-2837;
- [61] S. Morcos, *The British Journal of Radiology*, **80** (2007), 73–76;
- [62] D. DeHoratius, S. Cowper, *Seminars in Dialysis*, **19** (2006), 191–194;
- [63] P. Wunderbaldinger, A. Bogdanov, R. Weissleder, *Eur. J. Radiol.*, **34** (2000), 156-165;
- [64] C. Nichol, E. Kim, *J. Nucl. Med.*, **42** (2001), 1368-1374;
- [65] H. Benveniste, G. Einstein, K. Kim, C. Hulette, G. Johnson, *Proc. Natl. Acad. Sci.*

- U.S.A.*, **96** (1999), 14079-14084;
- [66] S. Dodd, M. Williams, J. Suhan, D. Williams, A. Koretsky, C. Ho, *Biophys. J.*, **76** (1999), 103- 109;
- [67] S. Aime, C. Cabella, S. Colombatto, S. Crich, E. Gianolio, F. Maggioni, *Journal of Magnetic Resonance Imaging*, **16** (2002), 394–406;
- [68] C. Rümenapp, B. Gleich, A. Haase, *Pharm Res*, **29** (2012), 1165-1179;
- [69] S. Kar, W. Boncher, D. Olszewski, N. Dollahon, R. Ash, S. Stoll, *J. Am. Chem. Soc.*, **132** (2010), 13960–13962;
- [70] R. Selinsky, J. Han, E. Pérez, I. Guzei, S. Jin, *J. Am. Chem. Soc.*, **132** (2010), 5997–16005;
- [71] J. Jung, M. Kim, J-H. Cho, S. Lee, I. Yang, J. Cho, S. Kim, C. Lee, J. Park, *Biomaterials*, **33** (2012), 5865-5874;
- [72] X. Kang, Z. Cheng, D. Yang, P. Ma, M. Shang, C. Peng, Y. Dai, J. Lin, *Adv. Funct. Mater*, **28** (2012), 1470-1481;
- [73] W. Di, X. Ren, H. Zhao, N. Shirahata, Y. Sakka, W. Qin, *Biomaterials*, **32** (2011), 7226-7233;
- [74] H. Peng, B. Cui, L. Li, Y. Wang, *Journal of Alloys and Compounds*, **531** (2012), 30-33;
- [75] R. Weissleder, H-C. Cheng, A. Bogdanova, A. Bogdanov, *J Magn Reson Imaging*, **7** (1997), 258-263;
- [76] A. Stroh, C. Faber, T. Neuberger, P. Lorenz, K. Sieland, P. Jakob, A. Webb, H. Pilgrimm, R. Schober, E. Pohl, C. Zimmer, *NeuroImage*, **24** (2005), 635–645;
- [77] M. Estévez, M. O'Donoghue, X. Chen, W. Tan, *Nano Res.*, **2** (2009), 448-461;
- [78] S. Bonacchi, D. Genovese, R. Juris, M. Montalti, L. Prodi, *Angew. Chem. Int Ed.*, **50** (2011), 4056-4066;
- [79] S. Shylesh, L. Wang, W. Thiel, *Adv.Synt. Catal.*, **352** (2010), 425-432;
- [80] X. Sun, F.Liu, L. Sun, Q. Wang, Y. Ding, *J Inorg Organomet Polym*, **22** (2012), 311–315;
- [81] P. Roonasi, A. Holmgren, *Applied Surface Science*, **255** (2009), 5891–5895;
- [82] A. Coats, J. Redfern, *Analyst.*, **88** (1963), 906 – 924;
- [83] J. C. G. Bünzli, G. R. Choppin, Lanthanides probes in life, *Chemical and Earth sciences*, Elsevier, (1989);
- [84] T. Mossmann, *J Immunol Methods*, **65** (1983), 55-63;

CAPÍTULO 6

Anexos

Anexos

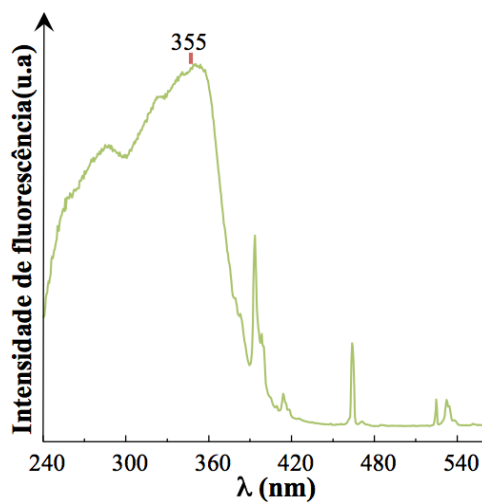


Figura S1. Espectro de excitação do complexo de fenantrolina+európio+3-APTS (C2) por fluorescência de estado sólido, à T_{amb} , monitorizado a 612 nm.

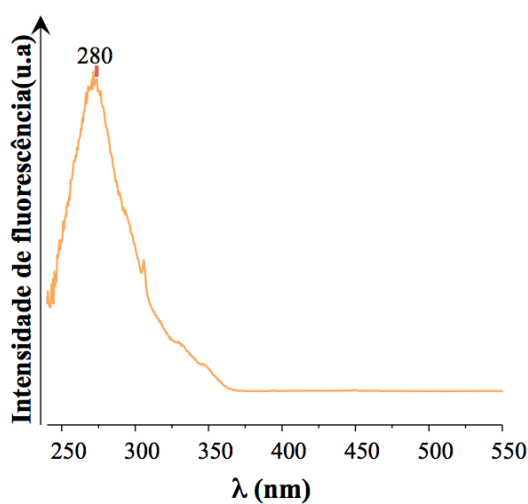


Figura S2. Espectro de excitação das nanopartículas de ferro funcionalizadas com o complexo C2 (NP-FeC2) por fluorescência de estado sólido, à T_{amb} , monitorizado a 612 nm.

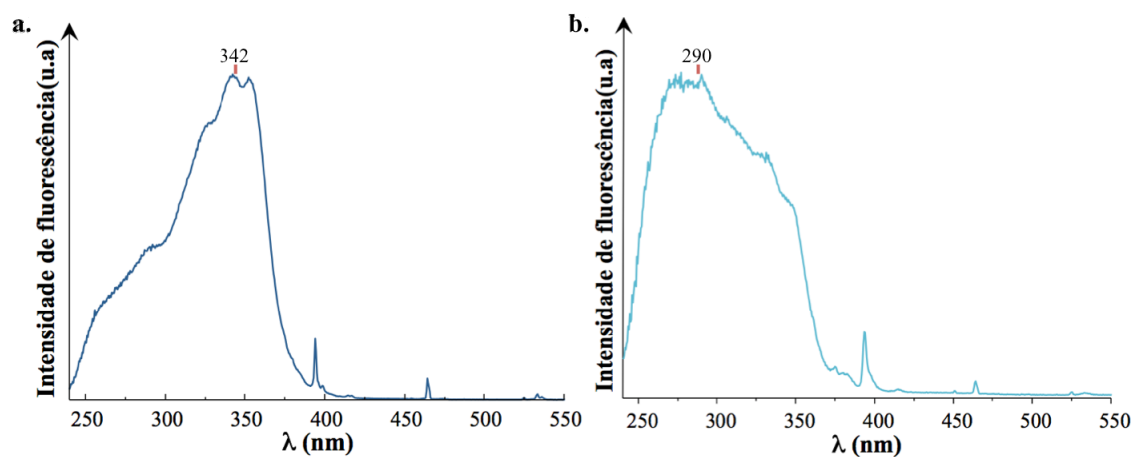


Figura S3. Espectros de excitação das nanopartículas de sílica funcionalizadas com o complexo C1 e C2 (NPSC1 (a.) e NPSC2 (b.)) por fluorescência de estado sólido, à T_{amb} , monitorizados a 619 e 614 nm, respectivamente.

